

**Aldehyd-oxidierende Enzyme
im anaeroben Phenylalanin-Stoffwechsel
von *Aromatoleum aromaticum***



Dissertation

Zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Lisa Lena Carlotta Debnar-Daumler (M. Sc.)
aus Frankfurt am Main

Erster Gutachter: Prof. Dr. Johann Heider
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Einreichung: 30.04.2014
Annahme: 18.07.2014
Disputation: 16.10.2014

Marburg/Lahn 2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis März 2013 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johann Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 18.07.2014 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung am 16.10.2014.

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden in einer Originalarbeit veröffentlicht:

Debnar-Daumler C, Seubert A, Schmitt G, Heider J (2014) Simultaneous involvement of a tungsten-containing aldehyde:ferredoxin oxidoreductase and a phenylacetaldehyde dehydrogenase in anaerobic phenylalanine metabolism. *Journal of Bacteriology* **196**: 483-492

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung.....	10
Summary.....	12
Einleitung.....	14
1 Abbau von aromatischen Verbindungen	14
2 Biologischer Abbau von Phenylalanin.....	15
3 Molybdän- und Wolframenzyme	16
4 Das <i>aor</i>-Operon in <i>Aromatoleum aromaticum</i>	19
5 Stoffwechsel von Molybdän und Wolfram	20
6 Aldehyd-Dehydrogenasen.....	23
Material und Methoden	25
1 Material	25
1.1 Chemikalien und Biochemikalien	25
1.2 Gase.....	25
1.3 Chromatographiematerial.....	25
2 Bakterienstämme, Plasmide und synthetische Oligonukleotide.....	26
3 Puffer, Medien und Kultivierung	30
3.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	30
3.2 Kultivierung von <i>Aromatoleum aromaticum</i>	30
3.2.1 Anzucht im Fermenter.....	32
3.3 Zellernte	32
3.3.1 Zentrifugation.....	32
3.3.2 Querstromfiltration	33
3.4 Zellextrakte.....	33
4 Molekularbiologische und genetische Methoden	35
4.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
4.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35

4.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	35
4.4	Präparation von genomischer DNA aus <i>A. aromaticum</i>	35
4.5	Polymerase-Kettenreaktion	36
4.5.1	Reinigung von PCR-Produkten	37
4.6	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	37
4.7	Kombinatorisches Klonieren	38
4.8	Sequenzierungen.....	40
4.9	Heterologe <i>in vivo</i> -Produktion der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (EbA4954) in <i>Escherichia coli</i>	40
5	Enzymatische Tests.....	41
5.1	Phenylalanin-Aminotransferase (Pat)	41
5.2	Phenylpyruvat-Decarboxylase (Pdc)	41
5.3	Phenylacetaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR)	41
5.4	Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PDH)	42
5.4.1	Rückreaktion	42
5.5	Phenylacetat-CoA-Ligase (PadJ)	42
5.6	Phenylglyoxylat:Akzeptor-Oxidoreduktase (PadEFGHI).....	43
5.7	Nitrat-Reduktase (Nar)	43
6	Proteinbiochemische Methoden	44
6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
6.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
6.2.1	Fällung von Proteinen für die SDS-PAGE.....	45
6.3	Nicht-denaturierende PAGE	45
6.3.1	Ferguson-Plot	46
6.4	Kovalente Vernetzung von Proteinuntereinheiten	47
7	Methoden zur Anreicherung von Proteinen	48
7.1	Säulenchromatographische Methoden.....	48
7.1.1	Anionenaustauschchromatographie.....	49
7.1.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie	49
7.1.3	Chromatographie an keramischem Hydroxyapatit	50
7.1.4	Gelfiltration	50
7.1.5	Affinitätschromatographie.....	50

7.2	Ammoniumsulfat-Präzipitation	51
8	Spektrometrische Methoden	53
8.1	Metallbestimmung (ICP-MS)	53
8.2	Proteinidentifikation durch Massenspektrometrie	53
9	Bioinformatische Methoden	54
	Ergebnisse	55
	Teil 2 (weiterführende Ergebnisse)	56
1	Anaerobes Wachstum von <i>Aromatoleum aromaticum</i>	56
1.1	Anaerobe Anzucht von <i>Aromatoleum aromaticum</i> im 100 l-Fermenter	56
1.2	Wachstum auf alternativen Substraten	58
1.3	Inhibition des Wachstums von <i>A. aromaticum</i> durch Wolfram.....	58
1.4	Enzymaktivitäten in verschiedenen Kulturen von <i>A. aromaticum</i>	59
1.4.1	Der Einfluss von alternativen C-Quellen auf Enzymaktivitäten in Zellextrakten	59
1.4.2	Der Einfluss von Molybdän und Wolfram auf den Abbau von Phenylalanin	60
2	Enzymreinigungen	63
2.1	Trennung der Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten mittels Chromatographie an DEAE-Sephrose	63
2.2	Anreicherung der AOR	65
2.2.1	Klonierung des <i>aor</i> -Gens für die homologe Überexpression	66
2.3	Anreicherung des NAD(P)-abhängigen Enzyms	67
2.4	Rekombinante Reinigung der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase.....	69
2.4.1	Lagerung und Verdünnung der rekombinanten PDH.....	70
3	Geplante Experimente	72
3.1	Knock-out-Mutationen.....	72
3.2	Heterologe Produktion von ModA und TupA	74
4	Bioinformatische Analysen	75
4.1	Phylogenetische Analyse von AOR-Sequenzen	75
4.2	Phylogenetische Analyse von MoaD-Sequenzen	77
	Diskussion	79
1	Phenylacetaldehyd-Oxidation durch AOR und PDH	80

1.1	Charakterisierung der PDH.....	80
1.2	Aufgaben von PDH und AOR in der Zelle	81
1.3	Die AOR als Wolfram-Enzym	82
1.4	Biochemie der AOR	83
2	Molybdän- und Wolfram-Enzyme	85
2.1	Einfluss von Wolfram auf das Zellwachstum.....	85
2.2	Gleichzeitige Produktion von Mo- und W-Enzymen	86
2.3	Strategien zur Diskriminierung von Mo und W bei der Biosynthese	87
2.3.1	Transport von Molybdat und Wolframat	87
2.3.2	Übertragung der Metalle auf den Cofaktor	88
2.3.3	Übertragung des Cofaktors auf die Zielenzyme	89
2.3.4	Transkriptions- und Translationsregulation des Mo- und W-Metabolismus	89
2.3.5	Assoziation von <i>aor</i> - und <i>moaD</i> -Genen	90
3	Ausblick.....	92
	Literatur	94
	Anhang	102
	Danksagung.....	105
	Wissenschaftlicher Lebenslauf	106
	Erklärung.....	107

Abkürzungsverzeichnis

Die im Text verwendeten Abkürzungen entsprechen den Standardabkürzungen des *FEBS Journal*.

Weitere verwendete Abkürzungen sind hier aufgeführt.

<i>A. aromaticum</i>	<i>Aromatoleum aromaticum</i>
ABC-Transporter	ATP-binding cassette Transporter
AHT	Anhydrotetracyclin
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AOR	(Phenylacet-)Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cPMP	zyklisches Pyranopterin-Monophosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEAE	Diethylaminoethyl
demin.	demineralisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. acidaminophilum</i>	<i>Eubacterium acidaminophilum</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii, et aliae, et alia (und andere)
FOR	Formaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GAPOR	Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
HABA	2-[4'-hydroxy-benzenazo]Benzoessäure
HEPPS	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
LB	Luria-Bertani/lysogeny broth
MCD	Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid-Cofaktor
Moco	Molybdän-Cofaktor
MPT	Molybdopterin/Metallopterin
Nar	Nitrat-Reduktase
OD	Optische Dichte

<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>p</i> -Cresol	<i>para</i> -Cresol
Pdc	Phenylpyruvat-Decarboxylase
PDH	Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase
PEG	Polyethylenglycol
PGD	Pyranopterin-Guanin-Dinukleotid
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SAM	S-Adenosylmethionin
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Trockenmasse
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tup	Tungsten uptake
vol/vol	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wco	Wolfram-Cofaktor
WOR	Wolfram-enthaltende Oxidoreduktase
Wtp	Wolframat-Transport-Protein

Zusammenfassung

Der anaerobe Abbau von Phenylalanin führt über das Zwischenprodukt Phenylacetat zu Benzoyl-CoA, dem häufigsten Intermediat im anaeroben Abbau von aromatischen Verbindungen. Das Zwischenprodukt Phenylacetat entsteht durch die Oxidation von Phenylacetaldehyd. Vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass *Aromatoleum aromaticum* sowohl eine Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) besitzt, die den Schritt katalysieren könnte, als auch ein oder mehrere Enzyme, die diese Oxidation mit NAD und NADP als Elektronenakzeptoren durchführen könnten. Folglich stellte sich die Frage, welches dieser Enzyme das Schlüsselenzym für den anaeroben Phenylalanin-Stoffwechsel darstellt. Außerdem ist die Entdeckung einer AOR in einem fakultativ anaeroben Bakterium ungewöhnlich, da AORs bisher ausschließlich aus obligat anaeroben, häufig hyperthermophilen Prokaryonten bekannt sind. *A. aromaticum* braucht ein Molybdän-Enzym zum denitrifizierenden Wachstum, nämlich die Nitrat-Reduktase. Alle bisher beschriebenen AORs enthalten das dem Molybdän sehr ähnliche Metall Wolfram. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, welches Metall die AOR aus *A. aromaticum* enthält.

Für beide Fragestellungen war es wichtig, die Phenylacetaldehyd-oxidierenden Enzyme aus *A. aromaticum*-Zellen anzureichern und im Idealfall aufzureinigen. Durch vielfältige chromatographische Verfahren gelang es, alle Enzymaktivitäten in einem für die Bearbeitung der Fragestellungen ausreichenden Maße anzureichern. Metallanalysen der angereicherten AOR-Fractionen und begleitende Wachstumsversuche mit verschiedenen Molybdat- und Wolframat-Konzentrationen zeigten, dass die AOR tatsächlich einen Wolfram-Cofaktor enthält und dieser nicht wirksam durch einen Molybdän-Cofaktor ersetzt werden kann. Folglich muss *A. aromaticum* zur selben Zeit spezifisch mindestens ein Mo- (Nitrat-Reduktase) und ein W-Enzym (AOR) herstellen können. Während die meisten Enzyme aus dem Molybdän-Cofaktor-Biosyntheseweg auch zur Biosynthese des Wolfram-Cofaktors dienen können, wurden in dieser Arbeit durch bioinformatische Analysen mehrere Enzyme gefunden, die eine Metall-Spezifität unterstützen könnten. Dazu gehören Molybdat- und Wolframat-spezifische Transporter und Enzyme, die das Metall auf den Cofaktor übertragen. Außerdem wurden Proteine aus dem Cofaktor-Biosyntheseweg gefunden, die in enger Assoziation mit AORs codiert werden und möglicherweise auch bei der Bereitstellung des richtigen Cofaktors eine Rolle spielen. Durch Anreicherung der NAD(P)-abhängigen Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten konnte das zugehörige Enzym, eine Aldehyd-Dehydrogenase, die durch das Gen *ebA4954* codiert wird, identifiziert werden. Die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PDH) wurde heterolog produziert, mithilfe eines C-terminalen Strep-Tags aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Es handelt sich um ein

Homotetramer, das sehr spezifisch für Phenylacetaldehyd ist, eine kooperative Kinetik zu diesem Substrat zeigt, stark durch steigende Phenylacetaldehyd-Konzentrationen inhibiert wird und sowohl NAD als auch NADP reduzieren kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der neuen Hypothese, dass die PDH das Schlüsselenzym für den Phenylalanin-Stoffwechsel ist. Es wurde gezeigt, dass die AOR nicht essentiell für das denitrifizierende Wachstum auf Phenylalanin ist, aber verschiedenste Aldehyde mit ähnlichen Reaktionsgeschwindigkeiten oxidieren kann. Deshalb ist es vorstellbar, dass der AOR eine Funktion zur Detoxifizierung reaktiver Aldehyde zukommt, wenn der Stoffwechsel aus dem Gleichgewicht gerät. Die Erkenntnis, dass *A. aromaticum* gleichzeitig Molybdän- und Wolfram-Enzyme produzieren kann, eröffnet viele neue Fragestellungen und Forschungsansätze.

Summary

Anaerobic degradation of phenylalanine proceeds via the intermediate phenylacetate to benzoyl-CoA which is the common intermediate in anaerobic degradation of aromatic compounds. Phenylacetate is formed by the oxidation of phenylacetaldehyde. At the beginning of this project it was known that *Aromatoleum aromaticum* contains on the one hand an aldehyde:ferredoxin oxidoreductase (AOR) that could catalyze this step and on the other hand one or more enzymes that could oxidize phenylacetaldehyde with NAD and NADP as electron acceptors. Consequently, the question arose, which of these enzymes was the key enzyme in anaerobic phenylalanine metabolism. Moreover, AOR is an unusual enzyme especially for a facultative anaerobic bacterium since AOR-type enzymes are exclusively known from obligatory anaerobic, often hyperthermophilic prokaryotes so far. *A. aromaticum* needs one molybdenum enzyme for denitrifying growth, the nitrate reductase. All AORs known to date contain tungsten which is a metal very similar to molybdenum. This leads to the question which metal the AOR from *A. aromaticum* contains.

For both questions it was important to enrich and, ideally, purify the phenylacetaldehyde-oxidizing enzymes from cells of *A. aromaticum*. Sufficient enrichment of all enzyme activities to advance the given tasks was achieved by using a multitude of different chromatographic techniques. Metal analyses of the enriched AOR fractions and accompanying growth experiments with varying molybdate and tungstate concentrations showed that AOR actually contains a tungsten cofactor which could not be replaced by a molybdenum cofactor to form active enzyme. Consequently, *A. aromaticum* needs to be able to simultaneously produce at least one Mo-enzyme (nitrate reductase) and one W-enzyme (AOR). Most of the enzymes needed for the biosynthesis of the molybdenum cofactor can be shared for biosynthesis of the tungsten cofactor. Within the project at hand several enzymes were identified by bioinformatics analyses that may promote metal specificity of the biosynthesis machinery. These include molybdate- and tungstate-specific transporters and enzymes that transfer the metal to the cofactor. Moreover, another protein from the biosynthetic pathway was found to be encoded in close association to *aor* genes and may therefore play a role in providing the right cofactor. The enrichment of the NAD(P)-dependent phenylacetaldehyde-oxidizing activities enabled the identification of the corresponding enzyme, an aldehyde dehydrogenase encoded by gene *ebA4954*. This enzyme (PDH) was heterologously produced, purified with the help of a C-terminal Strep-tag, and biochemically characterized. It is a homotetramer that is very specific for phenylacetaldehyde,

shows cooperative substrate-kinetics, is strongly inhibited by phenylacetaldehyde, and reduces both NAD and NADP.

The results summarized in the thesis at hand lead to the new hypothesis that PDH is the key enzyme for phenylalanine metabolism. It was shown that AOR is not essential for denitrifying growth on phenylalanine but oxidizes various aldehydes with similar reaction rates. Therefore it is imaginable that AOR serves as a detoxifying enzyme that oxidizes reactive aldehydes when the metabolism becomes unbalanced. The finding that *A. aromaticum* simultaneously produces molybdenum and tungsten enzymes leads to many new questions and research approaches.

Einleitung

1 Abbau von aromatischen Verbindungen

Phenylalanin ist neben Tryptophan und Tyrosin eine der drei aromatischen proteinogenen Aminosäuren und kommt somit ubiquitär in allen Lebewesen und auch ihren toten Überresten vor. In Pflanzen spielt Phenylalanin auch eine wichtige Rolle als Vorstufe für den Stoff Lignin (Davin et al, 2008), der nach Cellulose die zweithäufigste organische Verbindung ist und in die pflanzliche Zellwand eingelagert wird, um für die Verholzung und damit die Stabilität des Sprosses zu sorgen.

Der Abbau von Verbindungen, die einen aromatischen Ring enthalten, stellt besonders unter physiologischen Bedingungen eine Herausforderung dar. Der entscheidende Schritt ist dabei, die Resonanzenergie zu überwinden, die die Ringstruktur stabilisiert. Diese Energie entsteht durch die Delokalisation der π -Elektronen. Unter aeroben Bedingungen kann molekularer Sauerstoff verwendet werden, um die aromatische Gruppe durch Mono- oder Dioxygenasen zu hydroxylieren und damit angreifbarer zu machen. Anschließend wird ebenfalls Sauerstoff benötigt, um den Ring zu spalten (Fuchs et al, 2011). Zwischenprodukte, die dabei häufig entstehen, sind Brenzcatechin und Protocatechusäure.

Im Gegensatz dazu besteht die übliche anaerobe Strategie daraus, die Verbindungen durch CoA-Thioester zu aktivieren, die Seitenketten zu verkürzen und den Ring unter Aufwendung von Energie zu reduzieren (Teufel et al, 2010). Es werden also völlig andere Wege und Reaktionen benötigt als die, die aus dem aeroben Stoffwechsel bekannt sind. Obwohl Tarvin & Buswell (1934) schon 1934 herausgefunden hatten, dass aromatische Substrate auch in strikt anaeroben Kulturen vollständig zu CO_2 und H_2O abgebaut werden können, blieb lange Zeit unklar, welche Enzyme diese Abbaupfade katalysieren. Erst 1995 wurde das erste Enzym charakterisiert, das den Ring unter anaeroben Bedingungen dearomatisieren konnte (Boll & Fuchs, 1995). Zu diesem Zeitpunkt war schon bekannt, dass das zentrale Intermediat im anaeroben Aromatenabbau Benzoyl-CoA ist. Zu diesem Molekül werden die meisten aromatischen Verbindungen umgesetzt, bevor der aromatische Ring angegriffen wird. Dieser wird – anders als beim aeroben Aromatenabbau – nicht oxidiert, sondern unter Energieaufwand reduziert (Heider & Fuchs, 1997).

Der Weg vom Benzoyl-CoA zu Acetyl-CoA und CO_2 wurde inzwischen bereits gründlich erforscht und beinhaltet neben der Reduktion des Phenylrings eine Reihe von modifizierten β -Oxidations-Reaktionen (Fuchs et al, 2011). Inzwischen haben sich die Interessen den peripheren Wegen

zugewandt, die von den Ausgangsstoffen mit verschiedensten Substituenten zum Benzoyl-CoA führen. Diese Abbauwege beinhalten eine Fülle von interessanten Enzymen, die häufig neuartige Mechanismen oder Strukturen aufweisen. Die vorliegende Arbeit trägt zum Wissen über diese Abbauwege bei, indem ein ungewöhnlicher Schritt im anaeroben Stoffwechsel von Phenylalanin untersucht wurde.

2 Biologischer Abbau von Phenylalanin

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Modellorganismus *Aromatoleum aromaticum* kann Phenylalanin sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen vollständig zu CO₂ und Acetyl-CoA verstoffwechseln. Unter beiden Bedingungen geht man davon aus, dass der Abbau zur Phenylelessigsäure hin geleitet wird, die auch in verschiedenen anderen Stoffwechselwegen (z. B. Phenylethylamin- oder Phenylpropan-Abbau) als Intermediat vorkommt (Teufel et al, 2010; Wöhlbrand et al, 2007; Abbildung 1).

Unter denitrifizierenden Bedingungen wird Phenylalanin wahrscheinlich über den „Ehrlich-Weg“ durch eine Transaminierung und anschließende Decarboxylierung (Ehrlich, 1907; Rabus et al, 2005) zu Phenylacetaldehyd umgesetzt. Für beide Schritte wurden im Genom von *A. aromaticum* passende Gene gefunden, die für eine Phenylalanin-Aminotransferase (*pat*) und eine Phenylpyruvat-Decarboxylase (*pdc*) codieren (Rabus et al, 2005). Das entstehende Phenylacetaldehyd ist auch bekannt unter dem Namen Hyacinthin und wird bei einigen Pflanzen und Insekten als natürlicher Duftstoff bzw. natürliches Pheromon gefunden. Auch industriell wird es als Geruchs- bzw. Aromastoff verwendet. Die Oxidation von Phenylacetaldehyd zu Phenylelessigsäure ist der interessanteste Schritt im anaeroben Abbau von Phenylalanin und das Thema dieser Arbeit.

Aufgrund einer Studie mit dem Stamm *Thauera aromatica* (Schneider et al, 1997) und einer bereits bekannten Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase aus *Escherichia coli* (Ferrández et al, 1997; Rodríguez-Zavala et al, 2006) wurde für diesen Schritt eine NAD-abhängige Dehydrogenase (PDH) postuliert (Rabus et al, 2005). Wöhlbrand et al (2007) zeigten jedoch in ihrer Proteomstudie, dass *A. aromaticum* bei anaerobem Wachstum auf Phenylalanin nicht die postulierte PDH (codiert durch *ebA5381*) produzierte. Stattdessen wurde dieses Enzym spezifisch bei Wachstum auf *p*-Cresol induziert und spielt wahrscheinlich im Abbauweg dieses Substrats eine Rolle (vermutlich als *p*-Hydroxybenzaldehyd-Dehydrogenase, (Cronin et al, 1999; Wöhlbrand et al, 2007)). Bei Wachstum auf Phenylalanin wurde eine spezifisch induzierte Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) identifiziert, die große Ähnlichkeit zu archaeellen AORs zeigt (s. Kapitel 3). Die Aktivität

dieser AOR wurde bereits während meiner Masterarbeit (Debnar-Daumler, 2009) in Extrakten von *A. aromaticum*-Zellen, die anaerob auf Phenylalanin gewachsen waren, gemessen. Zusätzlich wurden jedoch auch Phenylacetaldehyd-oxidierende Aktivitäten sowohl mit NAD als auch mit NADP als Elektronenakzeptor nachgewiesen. Folglich scheint in den Zellen zusätzlich eine Dehydrogenase vorhanden zu sein, die Phenylacetaldehyd oxidiert, wenn auch höchstwahrscheinlich nicht die ursprünglich postulierte. Daher war nicht nur die Reinigung und Charakterisierung der AOR, sondern auch die Identität und Charakterisierung der NAD(P)-abhängigen Dehydrogenase Thema der vorliegenden Arbeit.

Die entstandene Phenylelessigsäure wird anschließend in einem α -Oxidationsweg, der bereits für *Azoarcus evansii* beschrieben wurde (Mohamed et al, 1993), weiter zu Benzoyl-CoA verstoffwechselt. Dabei wird Phenylelessigsäure zunächst durch eine Phenylacetat-CoA-Ligase (codiert durch *padJ*) zu Phenylacetyl-CoA aktiviert. Anschließend wird dieser CoA-Thioester mithilfe des Molybdoenzyms Phenylacetyl-CoA:Akzeptor-Oxidoreduktase (codiert durch *padBCD*) zu Phenylglyoxylat oxidiert. Dieses wird schließlich durch die Phenylglyoxylat:NAD-Oxidoreduktase (codiert durch *padEFGHI*) oxidativ zu Benzoyl-CoA decarboxyliert.

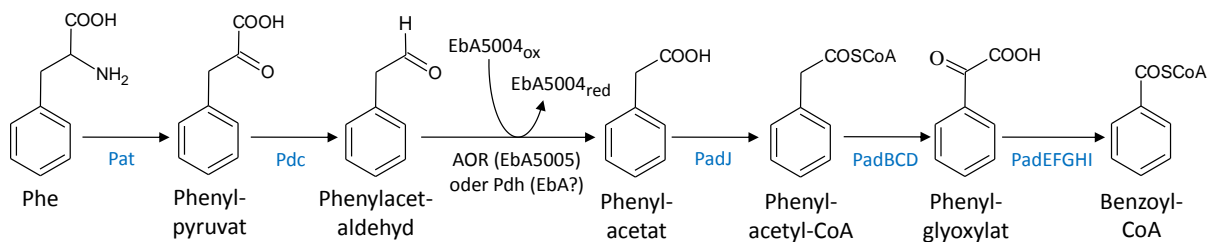


Abbildung 1. Postulierter anaerober Abbauweg von Phenylalanin in *A. aromaticum*. Pat: Aminotransferase; Pdc: Phenylpyruvat-Decarboxylase; EbA5004: im postulierten *aor*-Operon codiertes Ferredoxin; AOR: Phenylacetaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase; PDH: Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase, deren codierendes Gen im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert werden sollte; PadJ: Phenylacetat-CoA-Ligase; PadBCD: Phenylacetyl-CoA:Akzeptor-Oxidoreduktase; PadEFGHI: Phenylglyoxylat:NAD-Oxidoreduktase.

3 Molybdän- und Wolframenzyme

Phenylacetaldehyd wird in *A. aromaticum* durch eine Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) zu Phenylelessigsäure oxidiert. Dieses Enzym gehört zur Klasse der Molybdän- bzw. Wolfram-Enzyme. Molybdän und Wolfram ähneln sich sehr in ihrer Größe und ihren chemischen Eigenschaften. Molybdän ist das einzige Übergangsmetall aus der 5. Periode, das für die meisten Organismen aus allen drei Domänen des Lebens essentiell ist. Dies gilt seit den 1940er Jahren als gesichert (Hoagland, 1945; Horner & Burk, 1942). Wolfram steht in derselben Gruppe in der 6.

Periode und ist für viele Mikroorganismen essentiell – ganz besonders für anaerobe Mikroorganismen, die kein Molybdän nutzen (Hille, 2002). Wolfram ist erst seit den 1970er Jahren als Bestandteil mancher Enzyme bekannt (Andreesen & Ljungdahl, 1973). Dies betrifft bisher vor allem hyperthermophile Archaea. Allerdings sind einige Wolframenzyme auch in anaeroben Bakterien bekannt (Rauh et al, 2004), während sie in Eukaryonten bisher nie beobachtet wurden (Bevers et al, 2009). Nur für wenige Prokaryonten ist bisher bekannt, dass sie sowohl Molybdän- als auch Wolfram-Enzyme enthalten (da Silva et al, 2011).

Da Molybdän und Wolfram sich in ihren Eigenschaften sehr ähneln, werden beide Metalle in Enzymen durch einen identischen organischen Cofaktor koordiniert, der entsprechend dem enthaltenen Metall Moco oder Wco genannt wird (vgl. Kapitel 5). Einzige Ausnahme bildet die Nitrogenase, die zwar auch Molybdän enthält, das Metall aber in einem Eisen-Schwefel-Cluster-basierten Cofaktor koordiniert (Einsle et al, 2002). Hierbei gibt es zwar Isoenzyme mit Vanadium (Hales et al, 1986) oder Eisen (Chisnell et al, 1988) anstelle des Molybdäns, aber keine mit Wolfram. Die Struktur der enzymgebundenen Form des Wco wurde das erste Mal zusammen mit der Kristallstruktur der AOR aus *Pyrococcus furiosus* aufgeklärt (Chan et al, 1995).

Die Molybdän- und Wolframenzyme werden zusammen in vier Familien klassifiziert. Sie werden nach Sequenz- und Strukturhomologie, Aufbau des Cofaktors, der Koordination des Metalls und axialen Liganden am Metall differenziert (Bevers et al, 2009). Fast alle dieser Enzyme katalysieren Zwei-Elektronen-Oxidationen oder –Reduktionen durch den Transfer eines Sauerstoffatoms auf ein Substrat (Oxidasen oder Hydroxylasen) oder die Abstraktion eines Sauerstoffs (Reduktasen) (Kisker et al, 1997). Zwei der Familien, benannt nach den Enzymen Sulfat-Oxidase und Xanthin-Oxidase, enthalten nur Molybdän-Enzyme. Die dritte, die DMSO-Reduktase-Familie, enthält neben Molybdän- auch Wolfram-Enzyme, z. B. einige Formiat-Dehydrogenasen oder die Acetylen-Hydratase. Ein sehr gut untersuchter Vertreter dieser Enzymfamilie ist die Nitrat-Reduktase (NarGH_I; Magalon et al, 2011). Dieses Enzym enthält einen Molybdo-bis(Pyranopterin-Guanin-Dinukleotid)-Cofaktor (Mo-bisPGD) in der katalytischen Untereinheit NarG. Die zweite Untereinheit NarH transportiert Elektronen für die Nitrat-Reduktion über vier Fe-S-Cluster von der dritten Untereinheit NarI an, die in der Cytoplasmamembran verankert ist. An der Untereinheit NarI wird der Cofaktor Chinol oxidiert, der die Elektronen für die Nitratreduktion liefert. Diese drei Enzymuntereinheiten sind zusammen mit NarJ, einem Chaperon-artigen Protein, das für den Einbau des Molybdän-Cofaktors benötigt wird, in einem Operon (*narGHJI*) im Genom von *A. aromaticum* codiert (Rabus et al, 2005). Ein weiterer Vertreter der DMSO-Reduktase-Familie in *A. aromaticum* ist die Phenylacetyl-CoA:Akzeptor-Oxidoreduktase. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Phenylacetyl-CoA zu Phenylglyoxylat (Rhee & Fuchs, 1999). *A. aromaticum* braucht

also für den anaeroben Abbau von Phenylalanin neben der Nitratreduktase ein weiteres Molybdän-Enzym. Die vierte bekannte Enzymfamilie ist durch die Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktasen charakterisiert. Bis auf eine einzige Untersuchung aus *Proteus vulgaris*, in der ein AOR-ähnliches Enzym mit einem Molybdän-Cofaktor vorgestellt wurde (Trautwein et al, 1994), wurden bisher alle AORs als Wolfram-Enzyme beschrieben. AOR scheint eine wichtige Rolle in der Peptid-Fermentation von hyperthermophilen Archaea zu spielen. Besonders wegen der vorhandenen Kristallstruktur (Chan et al, 1995) ist die AOR aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* das am besten charakterisierte Enzym aus dieser Familie. Sie wurde das erste Mal von Mukund & Adams (1991) beschrieben und ist ein Homodimer mit einem Wolframatom pro Untereinheit. Jedes Wolframatom wird durch zwei Pterin-Liganden koordiniert, deren Phosphatgruppen wiederum durch ein Magnesium-Ion verbrückt werden (Abbildung 2). Weitere Repräsentanten der AOR-Enzymfamilie sind die Formaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (FOR; Roy et al, 1999) und WOR5 (Bever et al, 2005), die zusammen mit der AOR in *Pyrococcus furiosus* eine große Vielfalt an Aldehyden oxidieren können. Außerdem wurden aus *P. furiosus* auch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR; Mukund & Adams, 1995), die die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphoglycerat in einem modifizierten Embden-Meyerhof-Weg der Glykolyse katalysiert, und WOR4 (Roy & Adams, 2002), die möglicherweise eine Rolle im Schwefelstoffwechsel spielt, aufgereinigt und charakterisiert.

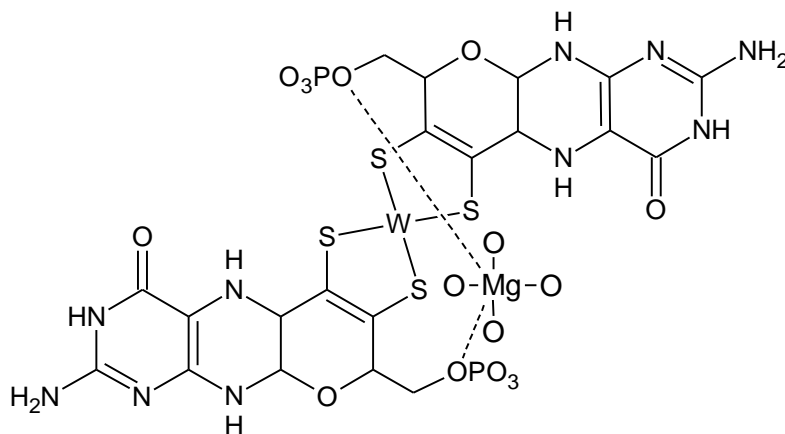


Abbildung 2. Bis-Tungstopterin-Cofaktor der AOR aus *Pyrococcus furiosus* vgl. Chan et al (1995).

4 Das *aor*-Operon in *Aromatoleum aromaticum*

Die postulierte Phenylacetaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) aus *A. aromaticum* wird in einem mutmaßlichen Operon codiert (Abbildung 3; Rabus et al, 2005). Neben dem Gen für die AOR (*ebA5005*) enthält dieses Operon vier weitere Gene, von denen zwei (*ebA5004* und *ebA5007*) beim anaeroben Wachstum auf Phenylalanin ebenfalls verstärkt exprimiert wurden (Wöhlbrand et al, 2007). Das erste Gen des Operons (*ebA5004*) ist als Gen für ein Eisen-Schwefel-Cluster-bindendes Protein annotiert und könnte für das Ferredoxin codieren, das der AOR als Elektronenakzeptor dient. Das zweite Gen (*ebA5005*) codiert für die AOR selbst, gefolgt von einem Gen für eine mutmaßliche Ferredoxin:NADH-Oxidoreduktase (*ebA5007*). Diese könnte das Ferredoxin sofort regenerieren, nachdem es von der AOR reduziert wurde. Der letzte Teil des *aor*-Operons (ursprünglich nur als ein Gen annotiert mit *ebA5010*) wurde in zwei offene Leserahmen reannotiert (Debner-Daumler, 2009). Das erste dieser Gene codiert ein Paralog des Molybdän-Cofaktor-Biosynthese-Proteins MoaD, während dem zweiten Gen bisher noch keine Funktion zugewiesen werden konnte.

Zusätzlich zu der hier beschriebenen AOR enthält das Genom von *A. aromaticum* noch ein weiteres paraloges Gen, welches *aor-1* genannt wurde (Rabus et al, 2005). Dieses Gen ist in einer vollständig anderen Umgebung codiert als das Gen für die AOR (Abbildung 3). Allein die MoaD-Domäne findet sich wieder und schließt sich hier als Proteinfusion direkt an den C-Terminus der AOR-1 an. AOR-1 hat nur 28 bzw. 27 % Sequenzidentität mit den AORs aus *A. aromaticum* bzw. *P. furiosus*. Dagegen sind die beiden AOR-Sequenzen aus *A. aromaticum* und *P. furiosus* zu 49 % identisch. Das *aor*-Operon von *P. furiosus* (Abbildung 3) codiert ebenfalls für ein MoaD-Paralog und enthält dahinter ein Gen für ein MoaA-ähnliches Enzym, das an einem der ersten Schritte in der Synthese des Pterin-Cofaktors beteiligt ist (vgl. Kapitel 5). Die beiden folgenden Gene im Genom von *P. furiosus* (*pf0343* und *pf0342*) gehören wahrscheinlich ebenfalls zu diesem Operon, da sie in sehr geringem Abstand codiert sind und keine offensichtlichen Promotorstrukturen erkennbar sind. Die Funktion des Produkts von Gen *pf0343*, einer potentiellen S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase, im Kontext mit einer AOR und den Enzymen des Cofaktor-Biosynthesewegs ist allerdings unklar. Gen *pf0342* codiert für ein hypothetisches Protein.

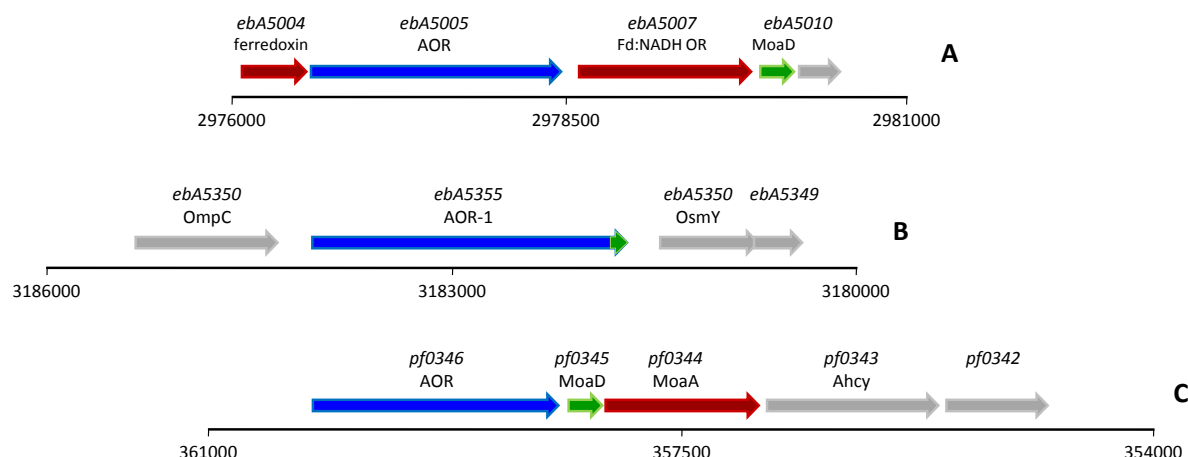


Abbildung 3. Die Codierung der beiden AORs aus *A. aromaticum* und der AOR aus *P. furiosus*. Gene für AORs sind blau, Gene bzw. Genabschnitte für MoaDs sind grün dargestellt. Für jedes Gen sind die entsprechende Bezeichnung im Genom und gegebenenfalls das Produkt gezeigt. Die Skalen zeigen Basen im jeweiligen Genom. **(A)** postulierte *aor*-Operon im Genom von *A. aromaticum*. Das Gen *ebA5010* wurde in Debnar-Daumler (2009) in zwei offene Leserahmen aufgeteilt, von denen einer für MoaD codiert. **(B)** *aor-1*-Gen aus *A. aromaticum* und benachbarte Gene. AOR-1 und MoaD werden zusammen in einem offenen Leserahmen codiert. Die gezeigten Gene liegen auf dem komplementären Strang. **(C)** postulierte *aor*-Operon im Genom von *P. furiosus*. Das Operon codiert für die AOR, MoaD und ein MoaA-ähnliches Enzym. Weiter abwärts befinden sich ein Gen für eine S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase (Ahcy) und ein Gen für ein hypothetisches Protein. Die gezeigten Gene liegen auf dem komplementären Strang.

5 Stoffwechsel von Molybdän und Wolfram

Die Oxoanionen Molybdat und Wolframat sind die biologisch verfügbaren Formen von Molybdän und Wolfram. Sie werden durch ABC-Transporter (ATP-binding cassette) aufgenommen. Ein gut untersuchter Transporter ist das Mod-System aus *E. coli*, das aus drei Untereinheiten besteht: dem periplasmatischen Bindeprotein ModA, der Permease ModB und dem ATP-Bindeprotein ModC (Aguilar-Barajas et al, 2011). Alle nötigen Gene für diesen Transporter wurden auch im Genom von *A. aromaticum* gefunden (Rabus et al, 2005). Die drei Untereinheiten sind in einem Operon durch die Gene *ebA2721*, *ebA2720* und *ebA2719* codiert. Interessanterweise findet man im Genom von *A. aromaticum* zusätzlich noch je eine weitere Kopie der Gene für ModA und ModB, *modA1* (*ebA3600*) und *modb1* (*ebA3597*). Für den spezifischen Wolframat-Transport wurden bisher zwei verschiedene ABC-Transporter gefunden. Das Tup-System (tungstate uptake) wurde in dem Gram-positiven, anaeroben Bakterium *Eubacterium acidaminophilum* gefunden (Andreesen & Makdessi, 2008; Makdessi et al, 2001). Das Wtp-System (Wolfram-Transport-Protein) wurde für *Pyrococcus furiosus* beschrieben (Bever et al, 2006). Beide haben eine deutlich höhere Affinität für Wolframat als für Molybdat.

Wie in Kapitel 3 beschrieben, werden Mo und W in Molybdän- und Wolframenzymen durch einen identischen Cofaktor koordiniert. Dieser Cofaktor (Moco für Molybdäncofaktor und Wco für Wolframcofaktor) ist ein trizyklisches Pyranopterin und wird über einen vierstufigen Biosyntheseweg synthetisiert (Abbildung 4), der in allen drei Domänen des Lebens hoch konserviert ist und schon ausführlich für Pflanzen, Menschen und Bakterien, darunter besonders *E. coli*, untersucht und beschrieben wurde (Leimkühler et al, 2011; Mendel & Kruse, 2012; Schwarz et al, 2009). Man geht davon aus, dass der Wco bis zum Einbau des Metalls auf die gleiche Weise synthetisiert wird wie Moco, da homologe Gene für alle benötigten Proteine auch in den Genomen von Wolfram-abhängigen Organismen gefunden wurden (Bever et al, 2009).

Alle Gene, die für die Synthese der Proteine benötigt werden, die am Aufbau des Moco beteiligt sind, wurden im Genom von *A. aromaticum* gefunden und sind im Folgenden in Klammern angegeben. Im ersten Schritt des Biosynthesewegs zum Moco wird GTP zu cPMP (zyklisches Pyranopterin-Monophosphat) umgesetzt. Darin sind das SAM-Radikal-Enzym MoaA (*ebA5430*) und das Enzym MoaC (*ebA7189*) involviert, von denen letzteres daran beteiligt ist, die Pyrophosphat-Gruppe abzuspalten. Im zweiten Schritt werden zwei Thiol-Gruppen auf cPMP übertragen; dabei entsteht MPT (Molybdopterin oder Metall-bindendes Pterin). Diese Reaktion wird katalysiert von je zwei Monomeren MoaD (*ebA6672*) und MoaE (*ebA6671*), die zusammen ein Heterotetramer bilden, die MPT-Synthase. Bevor der Schwefel auf den eigentlichen Cofaktor übertragen wird, wird MoaD durch MoeB (wahrscheinlich *ebA7215*) am konservierten C-Terminus adenyliert. Eine Cystein-Desulfurase konvertiert dann das entstandene Adenylat zu einem C-terminalen kovalenten Thiocarboxylat. Das Protein MogA (*ebA1027*) bindet mit hoher Affinität MPT und adenyliert es. Dabei entsteht das Intermediat MPT-AMP (adenyliertes MPT). Im letzten Schritt hydrolysiert MoeA (*ebA6673*) in Anwesenheit von Molybdat das MPT-AMP-Intermediat wieder und baut Mo in den Cofaktor ein. Je nachdem, in welches Protein der Cofaktor eingebaut werden soll, kann er noch modifiziert werden. Dabei wird zum Beispiel durch die Proteine MobA (bindet GTP) oder MocA (bindet CTP) ein Nukleotid an den Cofaktor gebunden. Die modifizierten Cofaktoren werden je nach enthaltenem Nukleotid Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid-Cofaktor (MGD) oder Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor (MCD) genannt. In einigen Enzymen wird das Metall durch zwei dieser Cofaktoren koordiniert. Dies ist zum Beispiel in der Nitratreduktase (Mo-bisPGD oder bisMGD) und der AOR (W-bis-MPT) der Fall (vgl. Kapitel 3).

Auch für die Enzyme der letzten Schritte der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese gibt es zusätzliche Gene im Genom von *A. aromaticum*. Wie schon in Kapitel 4 erwähnt, finden sich zwei zusätzliche Gene für MoaD-Paraloga, die jeweils sehr eng mit den Genen für die beiden AORs assoziiert sind. Darüber hinaus gibt es auch noch zwei weitere mögliche MoeA-Isomere (*ebA1078* und *ebA4355*).

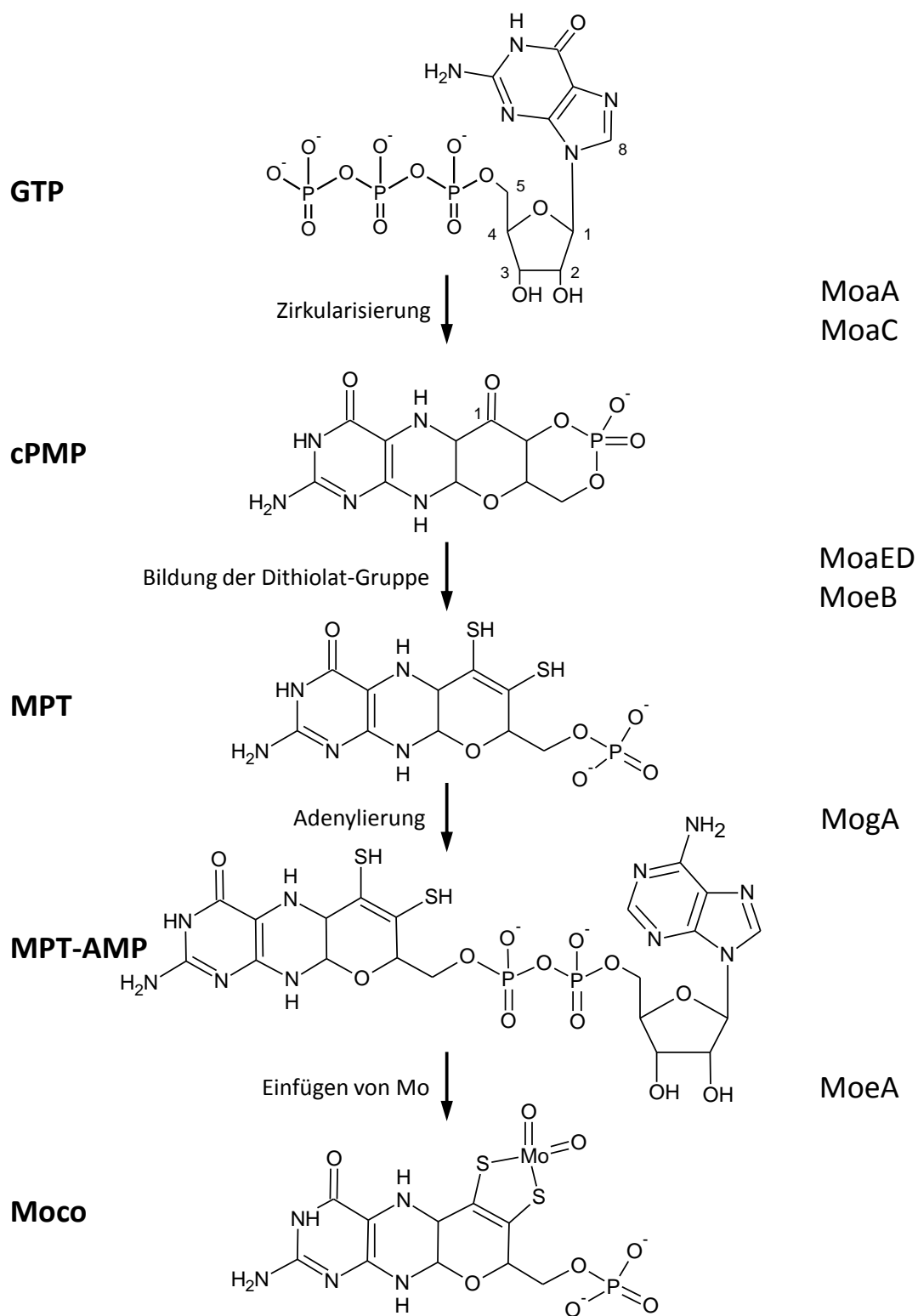


Abbildung 4. Biosynthese-Weg des Molybdän-Cofaktors (Moco). GTP, Guanosintriphosphat; cPMP, zyklisches Pyranopterin-Monophosphat; MPT, Molybdopterin; MPT-AMP, adenyliertes MPT. Auf der rechten Seite sind die an dem jeweiligen Schritt beteiligten Proteine, wie sie im Genom von *A. aromaticum* codiert sind, aufgelistet.

In Debnar-Daumler (2009) wurden die Sequenzen der mehrfach im Genom codierten Proteine (ModA, MoaD und MoeA) bereits mittels phylogenetischer Analyse untersucht und festgestellt, dass die jeweils zusätzlichen Kopien in phylogenetischen Stammbäumen den entsprechenden Proteinen aus Wolfram-abhängigen Prokaryonten ähnlicher sind als denen aus Molybdän-abhängigen Bakterien. Dies legt nahe, dass die AOR einen Wco enthalten könnte, der über einen spezifischen Biosyntheseweg auch parallel zur Synthese von Mo-Cofaktoren produziert wird. Dazu scheint es einerseits ein spezifisches periplasmatisches Bindeprotein für Wolframat zu geben, andererseits ein W-spezifisches MoeA-Typ-Enzym für den Metall-Einbau in den Cofaktor. Eine der Kopien von MoeA in *A. aromaticum* ist offenbar spezifisch für Mo, während eine andere spezifisch W auf den Cofaktor überträgt. Es ist bisher unklar, wozu mehrere Isomere des Proteins MoaD nötig sind, da es in keinem Schritt involviert ist, der direkt mit Mo oder W in Verbindung steht. Dennoch ist es auffällig, dass bei allen drei oben beschriebenen *aor*-Genen eine *moaD*-Kopie benachbart ist.

6 Aldehyd-Dehydrogenasen

Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDHs) katalysieren genau wie AORs die Oxidation von Aldehyden zu ihren korrespondierenden Carbonsäuren. Sie erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben in Organismen aus allen Domänen des Lebens. Zu diesen Aufgaben gehört einerseits Entgiftung, da Aldehyde eine hohe biologische Reaktivität zum Beispiel gegenüber Proteinen und DNA haben und diese irreversibel schädigen können (O'Brien et al, 2005). Durch die relativ weiten Substratspektren einiger ALDHs (Hirano et al, 2007; Schweiger et al, 2007) können verschiedenste Aldehyde detoxifiziert werden. Andererseits gibt es aber auch viele ALDHs, die spezifische Aufgaben in bestimmten Stoffwechselwegen übernehmen und daher ein sehr enges Substratspektrum aufweisen. Beispiele für ALDHs, die spezifische Rollen in physiologischen Abbauwegen haben, sind (i) die Betainaldehyd-Dehydrogenase, die Betain zum Beispiel als kompatibles Solut in der Regulation der Osmolarität von Bakterien produziert (Weretilnyk & Hanson, 1990), (ii) die Retinaldehyd-Dehydrogenase, die essentiell in der Zellentwicklung und -differenzierung ist (Niederreither et al, 2001) und (iii) die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase, die in den Abbauwegen von Phenylalanin und 2-Phenylethylamin wirkt. Die meisten bisher beschriebenen ALDHs verwenden NAD als Coenzym *in vivo*. Es gibt aber auch einige Vertreter, die auch oder sogar ausschließlich NADP reduzieren. Keine der bisher bekannten ALDHs enthält Cofaktoren. Eine gut charakterisierte Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase ist Pad aus *Escherichia coli* (Rodríguez-Zavala et al, 2006). Dieses Enzym ist ein Homotetramer, das sowohl NAD als auch NADP als Coenzym akzeptiert, aber eine höhere Affinität zu NAD zeigt. Im Laufe der vorliegenden Arbeit

sollte die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase aus *A. aromaticum* identifiziert und anschließend aufgereinigt und charakterisiert werden.

Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, in der größtmöglichen Reinheit von den Firmen Alfa Aesar (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Enzyme für die Molekularbiologie wurden bei New England Biolabs (Frankfurt) und Thermo SCIENTIFIC (Dreieich) gekauft.

1.2 Gase

Stickstoff (99,99 %) und Formiergas F5 (5 % Wasserstoff, 95 % Stickstoff) wurden von Airliquide (Düsseldorf) bezogen.

1.3 Chromatographiematerial

Material und Zubehör zur Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Größenausschlusschromatographie oder hydrophober Interaktionschromatographie wurden von GE Healthcare (München) und IBA (Göttingen) bezogen.

2 Bakterienstämme, Plasmide und synthetische Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Alle *Escherichia coli*-Stämme sind Derivate von *E. coli* K-12. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) hergestellt und sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 1. Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Aromatoleum aromaticum</i>	Wildtyp	Rabus & Widdel, 1995
<i>Escherichia coli</i> Dh5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ-	Woodcock et al, 1989

Tabelle 2. Verwendete Plasmide.

Plasmid	Vermittelte Resistenz	Referenz
pEntry-IBA20 (Donorvektor)	Kanamycin	IBA GmbH
pASG_IBA3 (Expressionsvektor)	Ampicillin	IBA GmbH
pASG_IBA5 (Expressionsvektor)	Ampicillin	IBA GmbH
pASG_IBA3_ebA4954_pdh	Ampicillin	diese Arbeit
pASG_IBA5_ebA4954_pdh	Ampicillin	diese Arbeit
pASG3_Mod ⁻ (Expressionsvektor)	Ampicillin	AG Heider
pASG3_Mod ⁺ (Expressionsvektor)	Ampicillin	AG Heider
pASG5_Mod ⁻ (Expressionsvektor)	Ampicillin	AG Heider
pASG5_Mod ⁺ (Expressionsvektor)	Ampicillin	AG Heider
pASG3_Mod ⁻ _aor	Ampicillin	diese Arbeit
pASG3_Mod ⁺ _aor	Ampicillin	diese Arbeit
pASG5_Mod ⁻ _aor	Ampicillin	diese Arbeit
pASG5_Mod ⁺ _aor	Ampicillin	diese Arbeit
pACYCDuet™-1	Chloramphenicol	Novagen®
pBBR1MCS-5	Gentamycin	Kovach et al, 1995
pK19mobsacB	Kanamycin	Schäfer et al, 1994

Tabelle 3. Verwendete synthetische Oligonukleotide.

Name	Zielgen oder -sequenz	Sequenz (5'-3')
aor_sense	<i>ebA5005</i>	AAGCTCTTCAATGGGATGGAATCGCAAGGTCC
aor_antisense	<i>ebA5005</i>	AAGCTCTTCACCCGGACAGCCCCAGCCGGGAC
pdh_for	<i>ebA4954</i>	AAGCTCTTCAATGCAGGTTTTCGACATGATCATCAAC
pdh_rev	<i>ebA4954</i>	AAGCTCTTCACCCAGCCTTCATGATCTTCAGCGTCTG
pE_IBA20_seq_fwd	Sequenzie- rung	GGGTTATTGTCTCATGAGCG
pE_IBA20_seq_rev	Sequenzie- rung	CCCCTGATTCTGTGGATAACC
1_tupA_ur_for	<i>ebA3597</i> , upstream- Flanke	AATCTAGAGGCAACGATCAGCCCCTGCTC
2_tupA_ur_rev	<i>ebA3597</i> , upstream- Flanke	TTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATCATGAAAAATCTCCGT GTGAAAAGAAACGT
3_tupA_dr_for	<i>ebA3597</i> , downstream- Flanke	TACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAAGTTGCGATCGCCGC GACGGCGACGGCGACG
4_tupA_dr_rev	<i>ebA3597</i> , downstream- Flanke	AATCTAGAGTCGATCGCTTCGCGCCACAC
5_tupA_CAT_for	<i>ebA3597</i> , Cm- Resistenz- Kassette	ACGTTTCTTTTCACACGGAGATTTTTCATGATACCTGTGACGGAAG ATCACTTCGCAGAA
6_tupA_CAT_rev	<i>ebA3597</i> , Cm- Resistenz- Kassette	CGTCGCCGTCGCCGTCGCGGCGATCGCAACTTACGCCCCGCCCTGC CACTCATCGCAGTA
1_moeAIII_ur_for	<i>ebA6673</i> , upstream- Flanke	AATCTAGACATGCGCTGTATGCCGACAAG
2_moeAIII_ur_rev	<i>ebA6673</i> , upstream- Flanke	TTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATCATGATTACGGGCGT AAATGTGAGTGGGC
3_moeAIII_dr_for	<i>ebA6673</i> , downstream- Flanke	TACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAAAATCATGAACATCAA AATCCTTTATTTTCGC
4_moeAIII_dr_rev	<i>ebA6673</i> , downstream- Flanke	AATCTAGAGCTCCAGACCGCAATGGACAC
5_moeAIII_CAT_for	<i>ebA6673</i> , Cm- Resistenz- Kassette	GCCCACTCACATTTACGCCCGTAAATCATGATACCTGTGACGGAAG ATCACTTCGCAGAA
6_moeAIII_CAT_rev	<i>ebA6673</i> , Cm- Resistenz- Kassette	GCGAAATAAAGGATTTTGATGTTTCATGATTTTACGCCCCGCCCTGC CACTCATCGCAGTA

Name	Zielgen oder -sequenz	Sequenz (5'-3')
1_modA_ur_for	<i>ebA2127</i> , upstream- Flanke	AATCTAGACTGATCCTGCTCGGCGACAAG
2_modA_ur_rev	<i>ebA2127</i> , upstream- Flanke	TTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTATCATCGCGGACCTCCCG GCGGCACCCGGTGT
3_modA_dr_for	<i>ebA2127</i> , downstream- Flanke	TACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAAATGGCGATCGACGC CGCTGGCCTCGCCGCG
4_modA_dr_rev	<i>ebA2127</i> , downstream- Flanke	AATCTAGACACCGTCAGGTGCGCGAACAG
5_modA_CAT_for	<i>ebA2127</i> , Cm- Resistenz- Kassette	ACACCGGGTGCCGCCGGGAGGTCCGCGATGATACCTGTGACGGAA GATCACTTCGCAGAA
6_modA_CAT_rev	<i>ebA2127</i> , Cm- Resistenz- Kassette	CGCGGCGAGGCCAGCGGCGTCGATCGCCATTACGCCCCGCCCTG CCACTCATCGCAGTA
1_aor_ur_for	<i>ebA5005</i> , upstream- Flanke	AATCTAGACGCATAGTTTCGCCGCTGCAC
2_aor_ur_rev	<i>ebA5005</i> , upstream- Flanke	TTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTATCATGATGTCCGCTCCTC TCAAGCCGCCGAG
3_aor_dr_for	<i>ebA5005</i> , downstream- Flanke	TACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAACCGCCGGATGATTC GCCGGGAGGGAGCGAG
4_aor_dr_rev	<i>ebA5005</i> , downstream- Flanke	AATCTAGAGTTCGGCTGGATCGCGGCAAC
5_aor_CAT_for	<i>ebA5005</i> , Cm- Resistenz- Kassette	CTCGGCGGCTTGAGAGGAGCGGACATCATGATACCTGTGACGGAA GATCACTTCGCAGAA
6_aor_CAT_rev	<i>ebA5005</i> , Cm- Resistenz- Kassette	CTCGCTCCCTCCCGGCGAATCATCCGGCGGTTACGCCCCGCCCTGC CACTCATCGCAGTA
1_pdh_ur_for	<i>ebA4954</i> , upstream- Flanke	AATCTAGAGACACCGCTTTCACGATGTCC
2_pdh_ur_rev	<i>ebA4954</i> , upstream- Flanke	GTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCCATCTCGTCTCCTTCAC GCTTGCATTGAAG
3_pdh_dr_for	<i>ebA4954</i> , downstream- Flanke	TTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACGGGGCTCCGCGGCTG GCCGGATGGAGGTG
4_pdh_dr_rev	<i>ebA4954</i> , downstream- Flanke	AATCTAGAACTTCATCCTGTCTGGAGATG

Name	Zielgen oder -sequenz	Sequenz (5'-3')
5_pdh_GAT_for	<i>ebA4954</i> , Gm- Resistenz- Kassette	CTTCAATGCAAGCGTGAAGGAGACGAGATGGACGCACACCGTGGA AACGGATGAAGGCAC
6_pdh_GAT_rev	<i>ebA4954</i> , Gm- Resistenz- Kassette	CACCTCCATCCGGCCAGCCGCGGAGCCCCGTTAGGTGGCGGTACTT GGGTCGATATCAAA

3 Puffer, Medien und Kultivierung

Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Seradest) hergestellt und anschließend sterilisiert. Dies geschah entweder mit feuchter Hitze bei 121°C und 1 bar Überdruck für 45 min (autoklavieren) oder im Falle hitzelabiler Stoffe durch Filtration mit Sterilfiltern (0,2 µM; Millipore, Eschborn). Lösungen und Medien, die unter anoxischen Bedingungen verwendet werden sollten, wurde vor dem Autoklavieren der Sauerstoff entzogen, indem die Flaschen durch Unterdruck entgast und anschließend mit 99,99 % Stickstoff begast wurden. Dies geschah in mindestens 10 Zyklen von je 2-4 min Dauer.

3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Alle *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium (Tabelle 4) angezogen. Dies enthielt gegebenenfalls 1,5 % Agar-Agar als Geliermittel für Nährböden und das entsprechende Antibiotikum für die verwendeten Plasmide und Stämme (Tabelle 1 und Tabelle 2). Die Inkubation erfolgte bei der jeweils angegebenen Temperatur. Flüssige Kulturen wurden entweder bei 200 rpm geschüttelt oder bei höchstmöglicher Geschwindigkeit auf dem Magnetrührer gerührt.

Tabelle 4. Zusammensetzung des LB-Mediums

LB-Medium (Lysogeny broth; verändert nach Bertani (1951))	Einwaage [g l ⁻¹]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	8

3.2 Kultivierung von *Aromatoleum aromaticum*

A. aromaticum wurde unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor kultiviert. Das Grundmedium (Tabelle 5) wurde in den Kulturflaschen von Sauerstoff befreit (s. o.) und autoklaviert. Autoklavierte Spurenelementlösung (Tabelle 6) und Selenit/Wolframatlösung (Tabelle 8) und steril filtrierte Vitaminlösung (Tabelle 7) wurden mit Spritzen im Verhältnis 1:1000 zum Medium hinzugefügt.

Tabelle 5. Grundmedium für die Anzucht von *A. aromaticum* (verändert nach Rabus & Widdel (1995)).

Komponente	Einwaage [g l ⁻¹]	Konzentration im Medium [mM]
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7
NH ₄ Cl	0,3	5,6
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,5	2,0
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,1	0,7
NaNO ₃	0,3	3,5

Tabelle 6. Spurenelementlösung SL10 (1000 ×; Rabus & Widdel (1995)).

Komponente	Einwaage [mg l ⁻¹]
Na ₂ EDTA	5200
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	2100
H ₃ BO ₃	30
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	100
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	24
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	24
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	29
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	144
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	36

Tabelle 7. Vitaminlösung VL7 (1000 ×; verändert nach Pfennig (1978)).

Komponente	Einwaage [mg l ⁻¹]
Cyanocobalamin (B12)	100
Pyridoxamin-dihydrochlorid (B6)	300
Thiamindichlorid (B1)	20
Ca-D(+)-Pantothenat (B5)	100
4-Aminobenzoessäure	80
D(+)-Biotin (B7)	20
Nicotinsäure (B3)	200

Tabelle 8. Selenit/Wolframat-Lösung

Komponente	Einwaage [mg l ⁻¹]
NaOH	400
Na ₂ SeO ₃ × 5 H ₂ O	6
Na ₂ WO ₄ × 2 H ₂ O	6

Das Medium wurde mit Natriumhydrogencarbonat gepuffert. Dazu wurde eine 1 M NaHCO_3 -Lösung separat in einer höchstens halb gefüllten Flasche angesetzt, anaerobisiert und autoklaviert und anschließend im Medium auf 40 mM verdünnt. Der pH-Wert des Mediums wurde gegebenenfalls noch auf 7,5 nachgestellt. Kohlenstoffquellen wurden 1 mM im Medium eingesetzt. Die Inkubation erfolgte stehend und dunkel bei 28°C. Kulturen für die Stammhaltung wurden bei Raumtemperatur inkubiert. In Regelmäßigen Abständen wurde die Nitrat- und Nitrit-Konzentration in den Kulturen überprüft (Quantofix® Nitrat; Macherey-Nagel, Düren) und, sofern beide Stoffe verbraucht waren, die Nitratkonzentration aus einer 1 M Stammlösung wieder auf 3,5 mM gebracht. Zum selben Zeitpunkt wurde auch die entsprechende Kohlenstoffquelle wieder auf 1 mM hinzugefügt. Das Bakterienwachstum wurde über die optische Dichte bei 578 nm verfolgt.

3.2.1 Anzucht im Fermenter

Die Anzucht von *A. aromaticum* im 100 l-Fermenter erfolgte im gleichen Medium, wie in Punkt 3.2 beschrieben. 80 l Medium wurden im Fermenter autoklaviert und anschließend über einen sterilen Trichter unter Stickstoffbegasung komplettiert. Dabei wurde NaHCO_3 , ohne es vorher zu lösen, ins Medium gegeben. Der Fermenter wurde mit 8 l einer Phenylalanin-adaptierten Kultur von *A. aromaticum* angeimpft, die eine OD_{578} von 1,52 hatte. Nitrat und Phenylalanin wurden an den ersten Tagen einmal, dann zweimal und schließlich dreimal täglich zugegeben. Am achten Inkubationstag wurde die Kultur bei einer OD_{578} von 1,42 geerntet. Die Ernte erfolgte nicht wie sonst üblich mit einer Durchflusszentrifuge, sondern die Zellen wurden durch eine Querstromfiltrationsanlage auf 11,5 l konzentriert und anschließend in anoxischen Zentrifugenbechern pelletiert (s. 3.3).

3.3 Zellernte

3.3.1 Zentrifugation

Für die Zellernte mit Zentrifugation wurde die SORVALL RC 5B plus-Zentrifuge (Thermo Electron, Dreieich) mit den Rotoren SLA-3000 SUPER-LITE® oder SORVALL GSA bei 4°C verwendet. Für anoxische Zellernten wurden die Zentrifugenbecher mindestens über Nacht im Anaerobenzelt inkubiert, damit am Kunststoff gebundener Sauerstoff wegdiffundieren konnte. *A. aromaticum* wurde bei 10.000 rpm, *E. coli* bei 6.000 rpm pelletiert. Die Überstände wurden abgegossen und die Zellpellets mit einem Spatel vom Gefäßboden abgeschabt und in geeigneten Behältnissen – Glasflaschen mit Gummistopfen bei anaerob gewachsenen Zellen, Kunststoffröhren bei aerob

gewachsenen Zellen – zusammengeführt und bei -80°C gelagert. Zellen von *A. aromaticum*, die in Kulturen von bis zu einem Liter Volumen gewachsen waren, wurden nach der Zentrifugation in möglichst wenig Aufschlusspuffer (10 mM Tris/HCl oder HEPPS/KOH pH 8,0) aufgenommen, mit ca. 10 % (v/v) Glycerin versetzt und ebenfalls bei -80°C gelagert.

3.3.2 Querstromfiltration

Da Zellen von *A. aromaticum* beim Zentrifugieren nur schlecht sedimentierten, wurde für die Ernte des Fermenters nicht, wie üblich, eine Durchlaufzentrifuge sondern eine Querstromfiltrationsanlage benutzt, die mit Gasdruck betrieben wurde. Als Gas, das die Anlage antreibt, wurde Stickstoff verwendet, um bei der Ernte möglichst wenig Sauerstoff in die Kultur zu leiten. Der Querstromfiltration liegt das Prinzip zugrunde, dass die Bakterienkultur an einer Membran (Pellicon 2 Cassette; Millipore, Eschborn) vorbeigeleitet wird, deren Poren für Bakterienzellen zu klein sind, das Medium aber durchlassen. Auf diese Weise wurden die Zellen immer weiter ankonzentriert, bis sie sich in einem Volumen von nur noch ca. 10 Litern befanden. An diesem Punkt wurde die konzentrierte Kultur in Kulturflaschen überführt, in ein Anaerobenzelt eingeschleust und in Zentrifugenbechern wie oben beschrieben pelletiert. Nach dieser Behandlung sedimentierten die Zellen recht gut und konnten in einem relativ trockenen Pellet vereinigt werden, der in Glasflaschen mit Gummistopfen bei -80°C gelagert wurde.

3.4 Zellextrakte

French Press. Anoxische Zellextrakte von größeren Mengen Zellen von *A. aromaticum* wurden mittels French Press (French Pressure Cell Press; American Instrument Company, Inc., Silver Spring, Maryland, USA) aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen aufgetaut und in möglichst wenig anoxischem Wasser gelöst. Um zu verhindern, dass die French Press-Zelle mit DNA verklebt, wurden die Bakterienzellen mit einer Spatelspitze DNase versetzt und ca. 10 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde im Anaerobenzelt in die vorgekühlte French Press-Zelle gefüllt, die über einen kurzen Schlauch mit Luer-Lock-Anschluss und Kanüle mit einer Serumflasche verbunden war. An der French Press wurden die Bakterien durch einmaliges Passagieren durch die French Press-Zelle bei 1000 psi aufgeschlossen und das Lysat in der Serumflasche aufgefangen. Die verschlossene Serumflasche wurde zurück ins Anaerobenzelt geschleust und das Lysat in Ultrazentrifugengefäße überführt. Zelltrümmer und Membranen wurden bei $100.000 \times g$ und 4°C für 60 min in einer Ultrazentrifuge mit Festwinkelrotor (Optima™ L-90K Ultracentrifuge; Beckman Coulter, Krefeld) sedimentiert. Der lösliche Zellextrakt wurde im Anaerobenzelt mit ca. 10 % (v/v) Glycerin versetzt und in Hungate-Röhrchen oder Müller-Krempel-Flaschen bei -80°C gelagert.

Ultraschall, anoxisch. Bereits in Aufschlusspuffer gelöste Zellpellets von *A. aromaticum* wurden unter anoxischen Bedingungen mittels Ultraschall (Sonifier 250; Branson, Danbury, Connecticut, USA) aufgeschlossen. Das Gerät wurde mit folgenden Einstellungen betrieben: Duty Cycle 65 %, Output Control 8, Output 30. Auch bei dieser Methode wurden die Zellen vor dem Aufschluss mit DNase versetzt und inkubiert. Die Ultraschallspitze wurde direkt in die Eppendorfcups mit den Bakteriensuspensionen gehalten und 30 Impulse wurden abgewartet. Anschließend wurden die Zellen auf Eis für mindestens 1 min abgekühlt. Darauf folgten noch ein bis zwei Impulszyklen. Zelltrümmer wurden in einer Tischzentrifuge (Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific, Dreieich) bei maximaler Geschwindigkeit ($17.000 \times g$) und 4°C für 30 min pelletiert.

Ultraschall, oxisch. *E. coli*-Zellen, in denen Proteine heterolog überproduziert worden waren, wurden unter oxischen Bedingungen mittels Ultraschall (SONOPULS HD 3200, Spitze: M73; BANDELIN electronic, Berlin) aufgeschlossen. Die Zellen wurden nach dem Auftauen in Aufschlusspuffer (100 mM HEPPS/KOH, pH 8,5, 100 mM KCl) gelöst und mit je einer Spatelspitze DNase I und Lysozym versetzt. Die Suspension wurde in ein Rosettengefäß überführt. Dieses Gefäß wurde in ein Eisbad gestellt und die Ultraschallspitze wurde so im Rosettengefäß ausgerichtet, dass es keine Berührungspunkte gab. Am Ultraschallgerät wurden eine Amplitude von 30 % und eine Gesamtzeit von 35 min eingestellt. Die Länge des Pulses betrug 260 s und die Länge der Pause 220 s. Aus diesen Einstellungen ergab sich eine Gesamtenergie von 35.678 kJ, die auf die Probe gegeben wurde. Zelltrümmer und Membranen wurden bei $100.000 \times g$ und 4°C für 60 min in einer Ultrazentrifuge mit Festwinkelrotor (OptimaTM L-90K Ultracentrifuge; Beckman Coulter, Krefeld) sedimentiert. Der lösliche Zellextrakt wurde entweder sofort weiter verwendet oder mit ca. 10 % (v/v) Glycerin versetzt und in Kunststoffröhren bei -80°C gelagert.

4 Molekularbiologische und genetische Methoden

4.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach einer Calciumchlorid-Methode von Inoue et al (1990) hergestellt. Dabei wurde als Vorkultur eine flüssige verwendet, anstelle einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte.

4.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Pro Transformationsansatz wurde ein 50 µl-Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 5 µl eines Restriktions-/Ligationsansatzes gemischt. Die Transformationsansätze wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 s einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg). Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis wurden 250 µl steriles LB-Medium zu den Ansätzen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C schüttelnd im Thermomixer für 15-60 min regeneriert. Auf LB-Agar-Platten, die das adäquate Antibiotikum enthielten, wurden 50-100 µl der Transformationsansätze (bei Transformationen mit Restriktions-/Ligationsansätzen das gesamte Volumen) ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C auf dem Deckel stehend inkubiert.

4.3 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*-Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie einer Transformationsplatte (s. Kapitel 4.2) angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Das gesamte Volumen wurde am nächsten Tag verwendet um die Plasmid-DNA mithilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits (Thermo SCIENTIFIC, Dreieich) nach Herstellerangaben zu isolieren. Die DNA wurde mit 50 µl Wasser eluiert, das zuvor auf 60°C erhitzt worden war. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Membran für 2 min bei 60°C in einem Heizblock inkubiert. Bis zur Weiterverwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

4.4 Präparation von genomischer DNA aus *A. aromaticum*

Genomische DNA aus *A. aromaticum* wurde leicht modifiziert, wie bei Murray & Thompson (1980) und Wilson (2001) beschrieben, isoliert. 10-50 mg zuvor eingefrorene Zellen wurden in 570 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM NaEDTA) resuspendiert. Die Zellmembranen wurden durch die anschließende Zugabe von 30 µl SDS-Lösung gelöst. Nach Zugabe von 3 µl Proteinase K-Lösung

(20 mg/ml TE-Puffer), um an die DNA gebundene Proteine zu zerstören, wurde das Gemisch für eine Stunde bei 50°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 100 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt, um zu verhindern, dass sich im nächsten Schritt ein CTAB-Nukleinsäure-Niederschlag bilden kann. Die CTAB/NaCl-Lösung (10 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid in 0,7 M NaCl) wurde auf 65°C vorgeheizt. 80 µl davon wurden verwendet, um die Zellwand in der Probe zu fällen und Proteine und Polysaccharide zu entfernen. Nach 10 min Inkubation bei 65°C wurde mit 700 µl Phenyl/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Dabei lösen sich die CTAB-Komplexe in der organischen Phase. Zur besseren Auftrennung der beiden Phasen wurde die Probe für 5 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion wie beschrieben wiederholt. Die wässrige Phase wurde wieder in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig mit 400 µl Isopropano überschichtet. Durch leichtes Schnippen mit dem Finger am Gefäß wurde die DNA als Niederschlag sichtbar und konnte zum Waschen mit einer Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol überführt werden. Die DNA wurde durch 5 min Zentrifugation bei 4°C und höchster Geschwindigkeit pelletiert. Zum Trocknen erfolgte für 5-10 min eine Vakuum-Zentrifugation. Die DNA wurde in 100 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst, mit 10 µl RNase I-Lösung (10 mg/ml TE-Puffer) versetzt und bei 4°C gelagert.

4.5 Polymerase-Kettenreaktion

Um gezielt DNA-Bereiche aus dem Genom von *A. aromaticum* oder aus Vektoren zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki et al, 1988) verwendet. Als Primer für die Reaktion dienten die in Tabelle 3 gezeigten Oligonukleotide. Diese wurden aus dem 5'- bzw. 3'-Bereich des zu amplifizierenden Gens abgeleitet. Für die Knock-out-Mutationen wurden die Oligonukleotide aus der upstream- oder downstream-Flanke des Gens, das durch eine Resistenzkassette ersetzt werden sollte, abgeleitet. Je nach Klonierungsstrategie enthielten sie zusätzlich die nötigen Schnittstellen oder Erkennungssequenzen für die verwendeten Restriktionsenzyme. Im Falle des kombinatorischen Klonierens (s. Kapitel 4.7) war dies die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Lgl. Für die Knock-out-Mutationen wurde die Schnittstelle für das Restriktionsenzym XbaI an die entsprechenden Oligonukleotide angehängt. Die anderen Oligonukleotide für die Knock-out-Mutationen wurden um die revers komplementäre Sequenz des jeweils benachbarten Oligonukleotids ergänzt um eine spätere Fusions-PCR zu ermöglichen (vgl. Ergebnisse, Kapitel 3.1). Als Template wurde entweder genomische DNA von *A. aromaticum* oder Plasmid-DNA von pACYCDuet-1 oder pBBR1MCS-5 verwendet. Die Reaktionen wurden in Ansätzen von je 50 µl mit dem PCR-Reaktionsansatz aus

Tabelle 9 und dem in Tabelle 10 aufgeführten Programm durchgeführt. Als Polymerase diente die Phusion® High-Fidelity-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt).

Tabelle 9. Zusammensetzung der Polymerase-Kettenreaktion.

Komponente	Eingesetzte Endkonzentration	
Forward-Primer	0,5	µM
Reverse-Primer	0,5	µM
dNTPs	0,2	mM
GC-Puffer (5 ×)	1	×
genomische oder Plasmid-DNA	1	µl
Polymerase	0,02	U µl ⁻¹
H ₂ O (deionisiert)	ad 50	µl

Tabelle 10. PCR-Programm.

	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	10 min	98°C
2. Denaturierung	10 s	98°C
3. Anlagerung	20 s	x°C*
4. Elongation (anschließend 29 × zurück zu 2.)	30 s pro 1000 bp	72°C
5. Elongation	5 min	72°C
6. Lagerung	∞	4°C

*55°C für Amplifikation des *aor*-Gens, 60°C für Amplifikation des *pdh*-Gens, Temperaturen für die Fragmente für die Knock-out-Mutationen je nach Primer-Paar.

4.5.1 Reinigung von PCR-Produkten

Um Polymerase, Primer und andere Komponenten der PCR aus den Ansätzen zu entfernen, wurden sie mit dem GeneJET™ PCR Purification Kit (Thermo SCIENTIFIC, Dreieich) nach Herstellerangaben gereinigt. Eluiert wurde die DNA mit 30 µl auf 50°C erhitztem Elutionspuffer. Die Membran wurde mit dem Puffer für 2 min bei 50°C inkubiert, bevor der letzte Zentrifugationsschritt folgte. Gereinigte PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

4.6 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA und PCR-Produkte wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese in Horizontalgelen analysiert. Dazu wurde 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) aufgekocht und auf einen Objektträger oder eine Glasplatte gegossen. In die noch flüssige Agaroselösung wurde ein Teflon-Kamm gestellt um Probenaschen auszubilden. Die DNA wurde mit 5 ×-Probenpuffer (50 % (w/v) Glycerin; 0,1 M EDTA; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und

in die Taschen pipettiert. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen wurde der DNA-Marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC, Dreieich) mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung zwischen 80 und 120 Volt in TAE-Puffer durchgeführt bis die blaue Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel in ein Färbebad mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) gelegt, um die DNA-Moleküle zu färben. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel unter UV-Licht bei 302 nm fotografiert.

4.7 Kombinatorisches Klonieren

Das in dieser Arbeit verwendete kombinatorische Klonieren wurde mit dem StarGate®-System der Firma IBA (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden die zu klonierenden Gene während der Amplifikation durch PCR über die Primer mit Schnittstellen für die Lg_{ul}-Restriktionsendonuklease versehen und das Stoppcodon durch ein CCC-Triplet ersetzt. Über diese Schnittstellen konnten die PCR-Produkte mit dem Donorvektor pEntry-IBA20 kloniert werden. Da Lg_{ul} eine Endonuklease des Typs IIS ist, konnten die Restriktionen des PCR-Produkts und des Vektors und die Ligation der beiden entstandenen Fragmente zur gleichen Zeit in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Die Zusammensetzung des Restriktions-/Ligationsansatzes ist in Tabelle 11 dargestellt. Die Ansätze wurden zunächst für eine Stunde bei 30°C inkubiert bevor sie über Nacht bei Raumtemperatur gelagert wurden. Anschließend wurden chemisch kompetente Zellen von *E. coli* Dh5α (s. Kapitel 4.1) mit 5 µl der Ansätze transformiert (s. Kapitel 4.2) und auf LB-Agar-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin (zur Selektion auf Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben) und 25 µg X-Gal/ml (zur Selektion auf richtige Klone durch den blau/weiß-Test) ausplattiert. Flüssiges LB-Medium wurde mit weißen Kolonien angeimpft, um am nächsten Tag die Plasmid-DNA wie beschrieben (s. Kapitel 4.3) zu isolieren. Um die Sequenz des vor der Klonierung amplifizierten Gens und die Insertion in den pEntry-Vektor zu überprüfen, wurden die isolierten Plasmide zur Sequenzierung weggeschickt (s. Kapitel 4.8). Richtige Plasmide wurden verwendet um das Insert in verschiedene Expressionsvektoren zu überführen.

Tabelle 11. Zusammensetzung der Restriktions-/Ligationsansätze zum Klonieren in den Vektor pEntry-IBA20.

Komponente	Eingesetzte Endkonzentration
PCR-Produkt	100 ng
pEntry-IBA20	25 ng
Tango-Puffer	1 ×
Dithiothreitol	10 mM
ATP	0,25 mM
Lgul	2,5 U
T4-Ligase	1 U
H ₂ O (deionisiert)	ad 50 µl

Der Donorvektor wurde zusammen mit jeweils einem gewünschten Expressionsvektor (s. Tabelle 2) erneut in einen Restriktions-/Ligationsansatz eingesetzt (Tabelle 12). Dabei wurde die Typ IIS-Restriktionsendonuklease Esp3I verwendet, die genau wie Lgul mit einem Nukleotid Abstand zur Erkennungssequenz schneidet. Auf richtige Insertion wurde wieder durch Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Dh5a-Zellen und anschließendes Ausplattieren auf LB-Agar-Platten mit 50 µg Ampicillin/ml und X-Gal selektiert. Weiße Kolonien wurden zum Animpfen von Expressionsvorkulturen verwendet.

Tabelle 12. Zusammensetzung der Restriktions-/Ligationsansätze zum Klonieren in die Expressionvektoren.

Komponente	Eingesetzte Endkonzentration
pEntry-IBA20-aor oder -ebA4954_pdh	100 ng
Expressionsvektor	25 ng
Tango-Puffer	1 ×
Dithiothreitol	10 mM
ATP	0,25 mM
Esp3I	5 U
T4-Ligase	1 U
H ₂ O (deionisiert)	ad 50 µl

4.8 Sequenzierungen

Die korrekte Sequenz von klonierten PCR-Produkten wurde nach der Methode von Sanger durch die Firma SeqLab vorgenommen.

4.9 Heterologe *in vivo*-Produktion der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (EbA4954) in *Escherichia coli*

Für die Produktion der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PDH) aus *A. aromaticum* durch die Expression des Gens *ebA4954* von Plasmid pASG_IBA5_ebA4954_pdh wurde der Stamm *E. coli* Dh5 α verwendet. 3 ml LB-Medium mit 80 μ g Ampicillin/ml (s. Kapitel 3.1) wurden mit einer weißen Einzelkolonie einer Transformationsplatte (s. Kapitel 4.2) angeimpft und über Tag schüttelnd bei 37°C inkubiert. Drei 100 ml-Erlenmeyerkolben mit je 30 ml LB-Medium mit 80 μ g Ampicillin/ml wurden mit je 500 μ l der über Tag-Kultur angeimpft und über Nacht schüttelnd (200 rpm) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD₅₇₈ der drei Vorkulturen gemessen. Als Hauptkultur wurden 2 l LB-Medium mit 80 μ g Ampicillin/ml in einem 5 l-Erlenmeyerkolben aus den Vorkulturen auf OD₅₇₈ 0,1 angeimpft und die tatsächliche OD₅₇₈ gemessen. Diese Kultur wurde auf einem Magnetrührer bei maximal möglicher Drehzahl bei 37°C inkubiert bis eine OD₅₇₈ von ca. 0,5 erreicht war. Um die Expression des *pdh*-Gens über den *tet*-Promotor zu induzieren, wurden 200 μ l AHT-Lösung (2 mg Anhydrotetracyclin/ml N,N-Dimethylformamid) zur Kultur gegeben und diese für weitere 3 h, nun bei 30°C, gerührt. Je 1 ml Probe wurde direkt vor der Induktion, nach 1,5 h und nach 3 h genommen und die Zellen wurden bei 10.000 rpm pelletiert. Zur gleichen Zeit wurde auch die OD₅₇₈ gemessen. Die Pellets wurden bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert. Außerdem wurde eine kleinere Kultur mitgeführt in der *E. coli* Dh5 α -Zellen wuchsen, die den entsprechenden leeren Vektor als Negativkontrolle enthielten. Diese Kultur wurde genauso behandelt wie die Hauptkultur. Die Kulturen wurden wie beschrieben (s. Kapitel 3.3.1) bei OD₅₇₈ 1,7-2,2 geerntet. Die Pellets wurden in gewogene Kunststoffröhrchen überführt, gewogen und bei -80°C gelagert. Die Zellen aus den zwischendurch genommenen Proben wurden in SDS-Probenpuffer (s. Kapitel 6.2) resuspendiert, um sie mittels SDS-PAGE analysieren zu können. Dazu wurden 50 μ l Puffer pro 1 ml Kultur der OD₅₇₈=1,0 eingesetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Je 12 μ l wurden auf ein 15 %iges Polyacrylamidgel geladen.

5 Enzymatische Tests

Enzymatische Tests wurden unter oxischen und anoxischen Bedingungen an Photometern der Firmen Agilent Technologies (Böblingen; Cary 60 UV-Vis), Analytik Jena (Jena; Spekol 1500) und Amersham Biosciences (Freiburg; Ultrospec 1100 pro) durchgeführt. Die Reduktionsmittel Natriumdithionit und Dithioerythritol wurden an jedem Messtag frisch angesetzt, ebenso Benzylviologen. Für alle Messungen wurden 1 ml-Kunststoffküvetten verwendet. Mit der Aufzeichnung der Messungen am Computer wurde begonnen, sobald sich die Küvette mit Testansatz und Enzym ohne Substrat im Photometer befand. Nach ca. zweiminütiger Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von Substrat gestartet.

5.1 Phenylalanin-Aminotransferase (Pat)

Die Aktivität der Phenylalanin-Aminotransferase Pat wurde im Extrakt von *A. aromaticum*-Zellen, die anaerob auf Phenylalanin gewachsen waren, nach einem Assay von Schneider et al (1997) unter anoxischen Bedingungen gemessen. Die Reaktion wurde an die Aktivitäten der Phenylpyruvat-Decarboxylase und der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase, die im Extrakt vorhanden sein sollten, gekoppelt. Die Reaktion wurde durch 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 anstelle von 200 mM Kaliumphosphat gepuffert. Als Aminogruppenakzeptor wurde 2-Oxoglutarat eingesetzt. Der Test wurde mit 2 mM Phenylalanin gestartet und die Reduktion von NAD zu NADH bei 365 nm verfolgt.

5.2 Phenylpyruvat-Decarboxylase (Pdc)

Die Aktivität der Phenylpyruvat-Decarboxylase Pdc wurde in demselben Zellextrakt wie Pat ebenfalls nach einem Assay von Schneider et al (1997) unter anoxischen Bedingungen gemessen. Der Test setzte sich wie der Test für Pat zusammen, enthielt allerdings kein 2-Oxoglutarat. Gestartet wurde die Reaktion mit 2 mM Phenylpyruvat und die Reduktion von NAD zu NADH wurde bei 365 nm verfolgt.

5.3 Phenylacetaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR)

Die Aktivität der Phenylacetaldehyd:Ferredoxin Oxidoreduktase (AOR) wurde nach einem Assay von Heider et al (1995) unter anoxischen Bedingungen bei ca. 27°C gemessen. Der Test setzte sich in 750 µl wie folgt zusammen: 100 mM Tris pH 8,4, 1,6 mM Benzylviologen, ca. 0,02 mM Natriumdithionit (Extinktion vor Enzymzugabe ca. 0,2). Die Reaktion wurde mit 2 mM Phenylacetaldehyd (Stammlösung 40 mM in Wasser, löst sich langsam) oder der gleichen Menge eines anderen Aldehyds gestartet. Aktives Enzym oxidierte das Aldehyd zu seiner entsprechenden

Carbonsäure und übertrug die beiden dabei frei werdenden Elektronen auf zwei Moleküle Benzylviologen. Die Zunahme von reduziertem Benzylviologen wurde durch die Zunahme der blauen Färbung bei 600 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient ϵ für Benzylviologen beträgt bei dieser Wellenlänge 7400 (M cm)^{-1} .

5.4 Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PDH)

Die Aktivität der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PDH) wurde mit einem modifizierten Assay nach Schneider et al (1997) gemessen. Dieser Assay wurde sowohl unter oxidischen als auch unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Der Test setzte sich in 750 μl wie folgt zusammen: 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8, 10 mM MgCl_2 , 2 mM Dithioerythritol, 1 mM NAD(P)^+ . Die Reaktion wurde mit Phenylacetaldehyd oder einem anderen Aldehyd gestartet. Die Reduktion von NAD(P)^+ wurde durch die Zunahme der Absorption bei 365 nm verfolgt. Nachdem festgestellt worden war, dass MgCl_2 im Test die Aktivität der rekombinanten PDH mit NADP um 30 % herabsenkt, wurde dieses Salz in den nachfolgenden Tests nicht mehr eingesetzt. Auf die Aktivität mit NAD hatte MgCl_2 keinen Einfluss. Die Aktivität der rekombinanten PDH war bei pH 8,5 am höchsten, sodass die folgenden Assays bei diesem pH-Wert in 100 mM HEPPS/KOH durchgeführt wurden.

5.4.1 Rückreaktion

Bei der Rückreaktion der PDH wird die Reduktion von Phenylelessigsäure mit NADH oder NADPH gemessen. Der Test setzte sich in 750 μl wie folgt zusammen: 100 mM MES/KOH pH 5,5, 6,0 oder 6,5, 2 mM Dithioerythritol, 1 mM NAD(P)H . Die Reaktion wurde mit 2 mM Phenylelessigsäure gestartet und die Abnahme der Absorption bei 365 nm verfolgt.

5.5 Phenylacetat-CoA-Ligase (PadJ)

Die Aktivität der Phenylacetat-CoA-Ligase wurde nach einem modifizierten Assay von Mohamed & Fuchs (1993) unter anoxischen Bedingungen gemessen. Der Test setzte sich in 750 μl wie folgt zusammen: 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 0,4 mM Coenzym A, 0,4 mM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 2 mM Dithioerythritol, 1,05 μl Myokinase (5,3 U), 0,375 μl Lactat-Dehydrogenase (0,375 U), 0,57 μl Pyruvatkinase (12,1 U). Die Reaktion wurde mit 0,33 mM Phenylelessigsäure gestartet. In diesem Test laufen vier enzymatisch katalysierte Reaktionen ab: (i) Phenylelessigsäure reagiert durch die Aktivität der PadJ mit ATP und Coenzym A zu Phenylacetyl-CoA, AMP und PP_i , (ii) AMP und ATP reagieren durch die Aktivität der Myokinase zu zwei ADP, (iii) zwei ADP und zwei Moleküle Phosphoenolpyruvat reagieren durch die Aktivität der Pyruvatkinase

zu zwei Pyruvat und zwei ATP, (iv) die Lactat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von zwei NADH mit zwei Molekülen Pyruvat wobei je zwei Moleküle Lactat und NAD gebildet werden. Die Abnahme der Absorption bei 365 nm durch die Oxidation von NADH zu NAD wurde gemessen.

5.6 Phenylglyoxylat:Akzeptor-Oxidoreduktase (PadEFGHI)

Die Aktivität der Phenylglyoxylat:Akzeptor-Oxidoreduktase PadEFGHI wurde in Extrakt von *A. aromaticum*-Zellen, die anaerob auf Phenylalanin gewachsen waren, nach einem Assay von Hirsch et al (1998) unter anoxischen Bedingungen gemessen. Jeder Test setzte sich in 750 µl wie folgt zusammen: 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8, 0,5 mM Coenzym A, 0,5 mM Thiaminpyrophosphat, 5 mM MgCl₂, 1 mM Benzylviologen, 2 mM Dithioerythritol, ca. 0,02 mM Natriumdithionit (Extinktion vor Enzymzugabe ca. 0,2). Die Reaktion wurde mit 3 mM Phenylglyoxylat gestartet und die Zunahme von reduziertem Benzylviologen durch die Zunahme der blauen Färbung bei 600 nm verfolgt.

5.7 Nitrat-Reduktase (Nar)

Die Reduktion von Nitrat wurde in 17.000 x g-Extrakten gemessen, die noch die Zellmembranen und folglich auch Membran assoziierte Proteine enthielten. Der Test enthielt in 750 µl 100 mM Tris/HCl (pH 8.4) und 1,6 mM Benzylviologen, das mit Natriumdithionit reduziert wurde um eine A₆₀₀ von ca. 1.5 zu erhalten. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Natriumnitrat (2 mM) gestartet und die Abnahme der Absorption bei 600 nm wurde verfolgt.

6 Proteinbiochemische Methoden

6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt, indem die Proteine mit Coomassie Brilliantblau G 250 gefärbt und die Extinktion bei 595 nm gemessen wurde. Als Referenzprotein zur Erstellung einer Standardgerade zwischen 0 und 100 µg Protein bei jeder Messung wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die Färbelösung wurde nach dem Ansetzen mithilfe einer Vakuumpumpe filtriert (0,45 µm, Millipore, Eschborn) und dunkel bei 4°C gelagert.

6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteinproben nach Proteinaufreinigungen und heterologen Produktionen wurden mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (Laemmli, 1970). Die gesamte Ausrüstung stammte von der Firma Bio-Rad (Mini-Protean; Bio-Rad, München). Gele (1 × 60 × 83 mm) wurden nach der angegebenen Rezeptur (Tabelle 13) mit der jeweils benötigten Acrylamidkonzentration gegossen. Als Erstes wurde das Trenngel gegossen und mit demineralisiertem Wasser überschichtet. Nach ca. 30 min wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt, um die Probentaschen zu definieren. Die Gele wurden nach dem Gießen entweder sofort benutzt oder in feuchte Tücher gewickelt bei 4°C gelagert.

Tabelle 13. Zusammensetzung von denaturierenden Polyacrylamidgelen.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
1 M Tris/HCl, pH 8,8	1,95 ml	–
1 M Tris/HCl, pH 6,8	–	0,235 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	8-15 % Endkonzentration	0,475 ml (6,9 %)
10 % SDS	0,055 ml	0,02 ml
5 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,055 ml	0,02 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0,078 ml	0,04 ml
H ₂ O	ad 4,827 ml	1,27 ml

Pro Tasche wurden 15-20 µg Protein aufgetragen. Von Proteinproben, die eine Proteinkonzentration von mindestens 1 mg/ml enthielten, wurde die entsprechende Menge mit

5 × Probenpuffer (20 % (v/v) 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 23 % (w/v) Glycerin; 40 % (v/v) 10 % (w/v) SDS-Lösung; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,05 % Bromphenolblau; H₂O demin. ad 10 ml) vermischt und für 5 min im Heizblock bei 95°C denaturiert. Von Proteinproben mit geringerer Konzentration wurde die benötigte Menge mit Aceton gefällt (s. 6.2.1). Zellpellets, die als Proben während einer heterologen Produktion eines Proteins genommen wurden, wurden wie folgt in 1 × Probenpuffer gelöst: Zellen aus 1 ml Kultur der OD_{578nm} 1 wurden in 50 μ l Probenpuffer gelöst und anschließend für 5 min bei 95°C inkubiert. Zellen aus Kulturen mit abweichenden optischen Dichten wurden in den entsprechenden Volumina Probenpuffer gelöst. Von den gelösten Zellen wurden 12 μ l pro Tasche aufgetragen. Als Proteinmassenstandard wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Dreieich) verwendet. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurde das Gel in die Laufanlage eingebaut, die mit Laufpuffer (200 mM Glycin; 3,5 mM SDS; 21 mM Tris) gefüllt wurde. Nach dem Auftragen der Proben, wurde eine Spannung von 80 V an das Gel angelegt. Sobald die Proben in das Trenngel gewandert waren, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde das Gel in Färbelösung (0,25 % (w/v) Brillant Blau R 250; 20 % (v/v) Ethanol; 20 % (v/v) Eisessig) aufgekocht und für mindestens 30 min geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung (20 % (v/v) Ethanol; 20 % (v/v) Eisessig) erneut aufgekocht und entfärbt. Zum Entfernen von störender Hintergrundfärbung und zur Lagerung des Gels wurde 10 % (v/v) Essigsäure verwendet.

6.2.1 Fällung von Proteinen für die SDS-PAGE

Proteinproben, die mit einer SDS-PAGE aufgetrennt werden sollten und eine geringere Konzentration als 1 mg/ml aufwiesen, wurden mit Aceton gefällt. Dafür wurde die benötigte Menge einer Proteinprobe mit 9 Volumen reinem, eiskaltem Aceton gemischt und für 10 min bis über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine für 15 min bei 4°C und 13.300 rpm pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet trocknen gelassen. Das Pellet wurde in 20 μ l 1 × Probenpuffer (s. 6.2) gelöst und für 5 min bei 95°C inkubiert. Das gesamte Volumen wurde in eine Tasche eines Polyacrylamidgels pipettiert.

6.3 Nicht-denaturierende PAGE

Die nicht-denaturierende PAGE wurde zur Auftrennung von Proteinen in ihrer nativen Konformation verwendet. Prinzipiell unterscheidet sich diese Methode in der Durchführung von der SDS-PAGE nur dadurch, dass weder reduzierende noch denaturierende Stoffe wie β -Mercaptoethanol und SDS eingesetzt werden. Die Polyacrylamidgele für diese Methode wurden,

wie in Tabelle 14 dargestellt, pipettiert und mit demselben Zubehör wie in 6.2 aber ohne Sammelgel gegossen.

Tabelle 14. Zusammensetzung von nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen

Komponente	Trenngel
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	6-10 % Endkonzentration
5 % TEMED	0,076 ml
10 % APS	0,109 ml
H ₂ O	ad 6,744 ml

Proteine wurden in der jeweils angegebenen Menge eingesetzt und vor dem Auftragen mit 2 × Probenpuffer (12,5 % (v/v) 1 M Tris/HCl pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerin; 1 Spatelspitze Bromphenolblau; H₂O demin. ad 15 ml) gemischt. Als Laufpuffer wurde 25 mM Tris mit 192 mM Glycin verwendet. Die Gele wurden bei 15 mA pro Gel und 4°C laufen gelassen. Gefärbt und gelagert wurden die Gele wie in 6.2.

6.3.1 Ferguson-Plot

Der Ferguson-Plot wurde zur Bestimmung der apparenten molekularen Masse der PDH durchgeführt. Er beruht auf dem Laufverhalten von Proteinen in nicht-denaturierenden Gelen mit verschiedenen Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen (Gallagher, 2001). Je zwei nicht-denaturierende Gele mit Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen von 6, 7, 8 und 9 % wurden gegossen und bei 4°C und 15 mA pro Gel für 1,93 h laufen gelassen. Nach dieser Zeit hatte die Lauffront in den 6 %-Gelen das untere Ende erreicht. Die Gele wurden wie beschrieben ge- und entfärbt und eingescannt. Als Standardproteine wurden Ovalbumin (20 µg pro Spur) und das Mono-, Di-, Tri- und Tetramer von Rinderserumalbumin (BSA; 80 µg pro Spur) verwendet. Von der PDH wurden 6,8 µg pro Spur verwendet. Am Computer wurden die Laufweiten der Proteine ausgemessen und durch Division mit der Gellänge in relative Laufweiten R_f umgerechnet. Der log R_f wurde gegen die Polyacrylamidkonzentrationen aufgetragen, Ausgleichsgeraden durch die Punkte gelegt und die Steigungen K_r der entstandenen Geraden abgelesen. Der log K_r wurde gegen den log der molekularen Massen der Standardproteine aufgetragen und anhand einer Ausgleichsgerade die apparente molekulare Masse der PDH berechnet.

6.4 Kovalente Vernetzung von Proteinuntereinheiten

Um die Komposition der Untereinheiten der PDH zu bestimmen, wurde das Protein kovalent vernetzt. Dazu wurde ein Protokoll nach Kessler et al (1992) verwendet. Zusätzlich zum dort verwendeten Dimethylsuberimidat wurde Glutardialdehyd als Vernetzer eingesetzt. Vernetzt wurde in vier verschiedenen Ansätzen, die jeweils einen Vernetzer von 7 oder 14 μM enthielten. Glutardialdehyd wurde mit demineralisiertem Wasser so verdünnt, dass es 1:10 und 1:20 eingesetzt werden konnte. 140 mM Dimethylsuberimidat wurden direkt vor dem Gebrauch in 200 mM Triethanolamin (TEA) gelöst. 500 μl einer Proteinprobe (3,4 mg PDH/ml) wurden mit 56 μl 2 M TEA pH 8,5 auf 200 mM TEA gebracht und das Gemisch wurde mit 14 μl 80 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt. Die Probe wurde gleichmäßig auf vier Reaktionsgefäße verteilt und die Vernetzer zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 2, 20, 60, 120 und 240 min wurden pro Ansatz je 20 μl Probe genommen, mit 5 μl SDS-Probenpuffer vermischt, für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Nachdem die letzten Proben auf diese Weise vorbereitet waren, wurden je 10 μl auf 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele geladen und wie in Punkt 6.2 beschrieben weiter behandelt. Als Negativkontrollen wurde die Proteinlösung vor Zugabe von TEA und DTT und die Proteinlösung nach Zugabe von TEA und DTT verwendet. Die zweite Probe wurde 240 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor sie mit Probenpuffer gemischt wurde. Als Marker diente erneut die PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Zur Auswertung der Vernetzung wurden zunächst die Laufweiten der Markerproteine durch die Laufweite der Lauffront geteilt um die relativen Laufweiten R_f zu erhalten. Diese wurden gegen den log der molekularen Massen der Markerproteine aufgetragen und eine Ausgleichsgerade wurde durch die Punkte gelegt. Aus der Geradegleichung konnten die apparenten molekularen Massen der vernetzten Proteinkomplexe berechnet werden.

7 Methoden zur Anreicherung von Proteinen

Diese Methoden dienen zur Anreicherung von Proteinen aus komplexen Proteingemischen. Dabei werden entweder natürliche Eigenschaften der Proteine, wie Ladung, Masse oder räumliche Ausdehnung, ausgenutzt oder genetisch angebrachte Tags.

7.1 Säulenchromatographische Methoden

Alle Säulenchromatographien wurden an Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Systemen durchgeführt. Vier verschiedene Geräte wurden im Verlauf dieser Arbeit verwendet: (i) eine Kombination aus zwei P-500-Pumpen (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), (ii) Pumpe P-50 (Pharmacia, Uppsala, Schweden), (iii), ÄKTAFPLC (amersham pharmacia biotech, Uppsala, Schweden), (iv) ÄKTApurifier (GE Healthcare, München). Alle Flüssigkeiten, die für die Chromatographie verwendet wurden, wurden vor Gebrauch filtriert (0,45 µm; Millipore, Eschborn). Säulen wurden bei 4°C in 20 % Ethanol gelagert. Um den Alkohol vor der Verwendung der Säulen zu entfernen, wurden sie gründlich mit demineralisiertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Säulen über mindestens 3 Säulenvolumen (SV) mit dem entsprechenden Grundpuffer äquilibriert. Bei Chromatographien unter anoxischen Bedingungen diente dieser Schritt auch dazu, im Säulenmaterial gelösten Sauerstoff zu entfernen. Proteinproben wurden, wenn möglich, vor dem Auftragen auf die Säule filtriert (0,45 µm; Millipore, Eschborn). Auf die Säule aufgetragen wurden die Proteinproben durch Probenschleifen oder sogenannte Super-Loops. Probenschleifen wurden mit Spritzen über das entsprechende Ventil direkt am FPLC-System befüllt, Super-Loops wurden erst gefüllt und anschließend an das System angeschlossen. Sowohl Probenschleifen bzw. Loops als auch Säulen wurden immer unter einem langsamen Fluss (0,3-0,5 ml/min) an die FPLC-Systeme angeschlossen, um zu vermeiden, dass Luftblasen in die Schläuche und auf die Säulenmaterialien geraten. Nach dem Laden der Proteinprobe auf die Säule wurden Proteine, die nicht an das Säulenmaterial gebunden hatten, durch Waschen mit mindestens zwei SV Grundpuffer entfernt. Die Elution erfolgte entweder als Stufengradient, wobei eine Stufe vier SV lang war, oder als linearer Gradient eines Elutionsmittels im Grundpuffer. Proteine wurden bei 280 nm detektiert und die Richtigkeit des angelegten Gradienten über einen Leitfähigkeitssensor überprüft. Nach der Elution wurden die Säulen mit einer hohen Konzentration des Elutionsmittels und anschließend mit Grundpuffer, Wasser und 20 % Ethanol gespült.

7.1.1 Anionenaustauschchromatographie

Bei der Anionenaustauschchromatographie wird ein Säulenmaterial verwendet, das negativ geladen ist. An dieses Material binden Proteine mit ihren positiv geladenen Aminosäuren. Eluiert wird mit den Kationen von Salzen wie zum Beispiel NaCl, KCl oder NH_4Cl . In dieser Arbeit wurden DEAE-Sepharose (Diethylaminoethyl, Sepharose-Beads, Partikelgröße: 90 μm), Q-Sepharose (quarternäres Amin, Sepharose-Beads, Partikel-Größe: 90 μm), Resource Q (quarternäres Amin, Polystyrol-Divinylbenzol-Beads, Partikelgröße: 15 μm) und Capto Q (quarternäres Amin, Agarose-Dextran-Beads, Partikelgröße: 90 μm) verwendet. Als Grundpuffer wurden, je nach gewünschtem pH-Wert und den geplanten weiteren Reinigungsschritten, 20 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) oder Kaliumphosphatpuffer (KPP) mit je 10 % (w/v) Glycerin verwendet. Als Elutionspuffer wurden KCl, NaCl oder NH_4Cl im Grundpuffer verwendet. Die Elution erfolgte durch Gradienten mit ansteigenden Salzkonzentrationen. Pro ml Säulenvolumen wurden zwischen 24 und 96 mg Protein auf die Säule geladen. Die Flussrate wurde an den Gegendruck der Säule angepasst. Wasch- und Elutionsschritte wurden in Fraktionen von 2,6 % (560 ml SV) bis 25 % (35 ml SV) des Säulenvolumens gesammelt.

7.1.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie wird ein Säulenmaterial verwendet, das hydrophobe Reste wie Phenyl oder Butyl enthält. An dieses Material binden Proteine mit ihren hydrophoben Oberflächen. Diese werden durch das antichaotrope Salz Ammoniumsulfat exponiert, da es mit dem Protein um Wassermoleküle für Hydrathüllen konkurriert. Eluiert wird mit abfallenden Konzentrationen von Ammoniumsulfat im Grundpuffer. Je höher die Anfangskonzentration an Ammoniumsulfat, desto mehr Proteine sollten an die Matrix binden können. In dieser Arbeit wurden Phenylsepharose (Sepharose-Beads, HiTrap Phenyl fast flow (high sub), Partikelgröße: 90 μm) und Butylsepharose (Sepharose-Beads, Partikel-Größe: 34 μm (high performance) oder 90 μm (fast flow)) verwendet. Als Grundpuffer wurden 20 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 0,2-1,0 M Ammoniumsulfat und 10 % (w/v) Glycerin verwendet. Die Proteinprobe wurde langsam mit der dem Puffer entsprechenden Anfangskonzentration $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt und anschließend durch einen Spritzenfilter (0,45 μm) filtriert bevor sie auf die Säule geladen wurde. Die Elution erfolgte durch Gradienten mit absteigenden Salzkonzentrationen. Pro ml Säulenvolumen wurden zwischen 13 und 110 mg Protein auf die Säule geladen. Die Flussrate wurde an den Gegendruck der Säule angepasst. Wasch- und Elutionsschritte wurden in Fraktionen von 100 % (1 ml SV) des Säulenvolumens gesammelt.

7.1.3 Chromatographie an keramischem Hydroxyapatit

Bei der Chromatographie an dem Säulenmaterial Hydroxyapatit ($[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, keramisch) binden Proteine durch verschiedene Wechselwirkungen ihrer geladenen Seitenketten mit den Ca^{2+} - und $\text{PO}_4^{\text{n-}}$ -Gruppen des Säulenmaterials. Eluiert wird mit ansteigenden Konzentrationen von Kaliumphosphatpuffer im Grundpuffer. Als Grundpuffer wurden 2 mM Tris/HCl pH 8,0 oder 2 mM Tris/Acetat pH 8,0 mit je 10 % (w/v) Glycerin verwendet. Pro ml Säulenvolumen wurden zwischen 2 und 10 mg Protein auf die Säule geladen. Die Flussrate wurde an den Gegendruck der Säule angepasst. Wasch- und Elutionsschritte wurden in Fraktionen von 33 % (15 ml SV) des Säulenvolumens gesammelt.

7.1.4 Gelfiltration

Die Gelfiltration oder Größenausschlusschromatographie wurde einerseits zur Anreicherung von Proteinen, andererseits zur Bestimmung der apparenten Masse von Proteinen verwendet. Als Säulen kamen die gekauften HiLoad 16/60 Superdex 200 PrepGrade (120 ml) und HiLoad 16/60 Superdex 75 PrepGrade (120 ml) und eine selbstgepackte Superdex 200 PrepGrade (570 ml) zum Einsatz. Kalibriert wurden die Säulen mit dem Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12,000-200,000 Da (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) nach Herstellerangaben. Das Kit enthält folgende Proteine: Cytochrom C (12,4 kDa), Carbonic Anhydrase (29 kDa), Albumin (66 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa) und β -Amylase (200 kDa). Die Retentionsvolumina wurden aufgezeichnet und halblogarithmisch gegen die Molekülmassen aufgetragen. Über die Formel der Ausgleichsgerade konnten die apparenten Molekülmassen der gesuchten Proteine berechnet werden. Die Volumina der aufgetragenen Anreicherungsfraktionen bzw. der reinen rekombinanten PDH betrugen zwischen 0,1 und 9 % des Säulenvolumens. Zwischen 0,3 und 250 mg Protein wurden aufgetragen. Als Puffer wurde 100 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 150 mM KCl verwendet. Die Elution wurde in Fraktionen von 2 % oder 2,5 % (120 ml SV) bis 2,6 % (570 ml SV) des Säulenvolumens gesammelt.

7.1.5 Affinitätschromatographie

Die rekombinant produzierte Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PDH) wurde über ihren N-terminal fusionierten Strep-Tag® aus Zellextrakten von *E. coli* Dh5 α (s. Kapitel 3.4) an Strep-Tactin-Säulenmaterial gereinigt. Dieses Säulenmaterial bindet ca. 10-15 mg Protein pro ml. Daher wurden ca. 30 mg Protein/ml Säulenvolumen aufgetragen, um möglichst die gesamte Kapazität der Säule auszunutzen. Als Grundpuffer wurden entweder 100 mM Tris/HCl pH 7,9 mit 100 mM NaCl oder 100 mM HEPES/KOH pH 8,5 mit 100 mM KCl verwendet. Eluiert wurde mit 2,5 mM

Desthiobiotin in Grundpuffer. Das Eluat wurde in Fraktionen von 20 % des Säulenvolumens aufgefangen. Die Säule wurde nach der Elution mit fünf Säulenvolumen 1 mM HABA in Grundpuffer regeneriert. Reine PDH wurde entweder mit ca. 10 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert oder als Arbeitsaliquot mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert (vgl. auch Ergebnisse, Kapitel 2.4.1).

7.2 Ammoniumsulfat-Präzipitation

Die Präzipitation von Proteinen mit Ammoniumsulfat kann neben den chromatographischen Methoden als Anreicherungsschritt dienen. Außerdem ist sie wichtig in Verbindung mit der hydrophoben Interaktionschromatographie (s. Kapitel 7.1.2). Wird eine Proteinlösung mit dem antichaotropen Salz Ammoniumsulfat versetzt, kommt es zum sogenannten Aussalzen. Die Salzionen konkurrieren mit den geladenen Aminosäure-Seitenketten um das Lösungsmittel, das Hydrathüllen um die Moleküle bildet. Dadurch lagern sich die Proteine in ihrer nativen Form über hydrophobe Wechselwirkungen aneinander an und fallen aus. Unterschiedliche Proteine fallen bei unterschiedlichen Ammoniumsulfat-Konzentrationen aus, da sie verschiedene Aminosäuren exponieren. In dieser Arbeit wurden die benötigten Mengen an Ammoniumsulfat aus dem Nomogramm nach Green & Hughes (1955; Tabelle 15) abgelesen. Die Präzipitationen wurden unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde die Proteinprobe über einen Zeitraum von 30-45 min langsam und durch häufiges, vorsichtiges Mischen auf 30 % Sättigung gebracht. Ausgefallene Proteine wurden für 30 min bei ca. 6000 rpm pelletiert und anschließend in Ammoniumsulfat-freiem Puffer wieder gelöst. Der Überstand wurde wie beschrieben auf 60 % Sättigung gebracht und ausgefallene Proteine wurden erneut abzentrifugiert und in Puffer gelöst. Die verschiedenen Fraktionen wurden für Enzymaktivitätsassays genutzt.

Tabelle 15. Nomogramm zur Bestimmung der Ammoniumsulfat-Menge, die benötigt wird um eine bestimmte Konzentration (in % der Sättigung) bei 25°C einzustellen (modifiziert nach Green und Hughes, 1955).

	Endkonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)																	
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
	Zuzugebendes Ammoniumsulfat (g/L)																	
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767	
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
50										33	66	101	137	176	214	302	392	
55											33	67	103	141	179	264	353	
60												34	69	105	143	227	314	
65													34	70	107	190	275	
70														35	72	153	237	
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

8 Spektrometrische Methoden

8.1 Metallbestimmung (ICP-MS)

Um den Gehalt verschiedener Metalle während der AOR-Anreicherungsprozedur zu messen, wurde von jeder aktiven Fraktion ein Aliquot zur Analyse mittels ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) in die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seubert (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg) gegeben. Die Fraktionen nach den Chromatographie-Schritten wurden zuvor mit einem Zentrifuge (30 kDa; Sartorius, Göttingen) ankonzentriert und die Proteinkonzentration wurde bestimmt (s. Kapitel 6.1). Für jede Probe wurde als Kontrolle der entsprechende Puffer abgegeben.

8.2 Proteinidentifikation durch Massenspektrometrie

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden aus den entsprechenden Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Identifikation bei Dr. Uwe Linne (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg) abgegeben.

9 Bioinformatische Methoden

Bioinformatische Analysen wurden mit den in Tabelle 16 aufgelisteten Programmen, Online-Datenbanken und den darüber zugänglichen Werkzeugen durchgeführt.

Tabelle 16. Programme und Online-Datenbanken für bioinformatische Analysen.

Programm/Datenbank	Hersteller/Zitat
NCBI	U.S. National Library of Medicine
BLAST	(Altschul et al, 1990)
Expasy	(Artimo et al, 2012)
SWISS-Model	(Arnold et al, 2006)
PyMOL	(Schrödinger & LLC, 2010)
DNAMAN 4.11	Lynnon BioSoft
pDRAW32	www.acaclone.com

Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit besteht aus zwei Teilen. Der erste Teil ist die Publikation

Debnar-Daumler C, Seubert A, Schmitt G, Heider J (2014) Simultaneous involvement of a tungsten-containing aldehyde:ferredoxin oxidoreductase and a phenylacetaldehyde dehydrogenase in anaerobic phenylalanine metabolism. *Journal of Bacteriology* **196**: 483-492

in englischer Sprache, die durch das *Journal of Bacteriology* veröffentlicht wurde. Der Inhalt dieser Publikation wird aus urheberrechtlichen Gründen im vorliegenden Exemplar der Dissertation nicht abgedruckt. Unter folgendem Verweis ist jedoch ein Online-Zugriff auf die oben genannte Publikation von der Universitätsbibliothek Marburg aus möglich:

<http://jb.asm.org/content/196/2/483.abstract?sid=ef0fdf7b-ba85-4d4a-a4ad-e6f5ca4608ec>

Die Rohform des gesamten Textes der Publikation und alle Experimente mit Ausnahme der im Folgenden aufgelisteten stammen von mir. Die Metallanalyse mittels ICP-MS wurde in der Gruppe von Prof. Dr. Andreas Seubert am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Das in der Publikation beschriebene Experiment zur Wachstumsinhibition durch Wolframat wurde von Dr. Georg Schmitt am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Ergebnisse, die nicht in dieser Veröffentlichung beschrieben wurden, werden im zweiten Teil in deutscher Sprache erläutert.

Teil 2 (weiterführende Ergebnisse)

1 Anaerobes Wachstum von *Aromatoleum aromaticum*

In meiner Publikation (Debnar-Daumler et al, 2014) wurde das anaerobe denitrifizierende Wachstum von *Aromatoleum aromaticum* auf Phenylalanin beschrieben und unter anderem wurden auch die Wachstumsraten der verschiedenen Kulturen verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass *A. aromaticum* in mit Gummistopfen versehenen Flaschen (100 ml-1 l) deutlich schneller wuchs als im 100 l-Fermenter im Batch-Modus. Folglich konnten auch für die in Flaschen angezogenen Kulturen höhere Verbrauchsdaten (metabolische Quotienten) von Phenylalanin und Nitrat erwartet werden als für die Fermenter-Kulturen. Gleichzeitig wurde aber auch festgestellt, dass die Supplementation des Minimalmediums mit verschiedenen Konzentrationen von Molybdat und Wolframat keinen Einfluss auf die Wachstumsrate hatte. Auf enzymatischer Ebene wurden hingegen deutliche Unterschiede zwischen den Aktivitäten repräsentativer Enzyme in Extrakten der verschiedenen Kulturen festgestellt. In den folgenden Abschnitten werden weitere Experimente in Bezug auf das anaerobe Wachstum von *A. aromaticum* und die damit zusammenhängenden Enzymaktivitäten vorgestellt.

1.1 Anaerobe Anzucht von *Aromatoleum aromaticum* im 100 l-Fermenter

Um für die native Reinigung von Proteinen ausreichend Zellmasse zu erhalten wurde *A. aromaticum* im Fed-Batch-Modus in einem 100 l-Fermenter angezogen. Wie oben beschrieben wurde dabei das Standard-Mineralsalzmedium mit 148 nM Molybdat und 18 nM Wolframat verwendet (s. S. 30). Waren Nitrat und Nitrit nicht mehr nachweisbar, wurden Phenylalanin und Natriumnitrat aus sterilen Vorratslösungen unter Stickstoffbegasung der Kultur in den Fermenter gegeben. Die durch Messen des Anstiegs der OD₅₇₈ erhaltene Wachstumskurve ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Kultur wurde bei OD₅₇₈ 2,4 unter anoxischen Bedingungen durch Querstromfiltration und anschließende Zentrifugation bei 17.000 × g geerntet und die Zellen bei -80°C in Müller-Krempel-Flaschen gelagert.

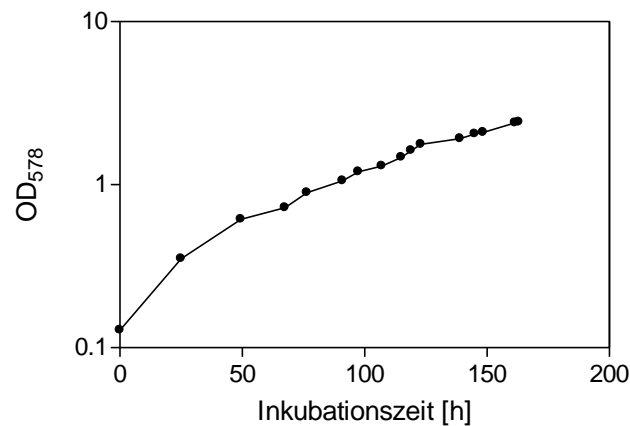


Abbildung 5. Wachstumskurve von *A. aromaticum* bei anaerober Anzucht auf Phenylalanin unter denitrifizierenden Bedingungen im 100 l-Fermenter. An jedem Messpunkt wurden Phenylalanin und Nitrat wie oben beschrieben zugegeben. Ernte der Zellen bei OD₅₇₈ 2,4.

Um die später gemessenen Enzymaktivitäten mit dem beobachteten Wachstum ins Verhältnis setzen zu können, wurden die sogenannten metabolischen Quotienten (q) für den Phenylalanin-Abbau (q_{Phe}) und die NO_3^- -Reduktion (q_{Nitrat}) berechnet (s. auch Ergebnisse, Teil 1). Dazu wurden zunächst die Verdopplungszeiten t_d [h] bestimmt. Diese Verdopplungszeiten und auch alle weiteren daraus berechneten Werte können nur grobe Näherungen sein, da in dem verwendeten Modus kein exponentielles Wachstum realisiert werden konnte. Für die gesamte Inkubationszeit betrug t_d 38 h. Betrachtete man nur die letzten 24 Stunden der Inkubation, betrug die Verdopplungszeit hingegen 71 h. Aus der Beziehung $\mu = \ln 2 / t_d$ erhält man die Wachstumsrate μ [min^{-1}] der Kultur. Die Wachstumsrate μ muss nun noch auf das eingesetzte Wachstumssubstrat und die erhaltene Proteinmenge bezogen werden. Dazu teilt man μ durch den Ertrag Y [g TM/mol Substrat], der angibt, wie viele Gramm Trockenmasse (TM) aus einem Mol Substrat gebildet werden können. Man geht davon aus, dass bei der anaeroben Atmung 33 % des Substrats in Trockenmasse umgesetzt werden. Ein Milligramm Trockenmasse besteht zu ca. 50 % aus Proteinen, sodass der errechnete Wert verdoppelt werden muss, um den metabolischen Quotienten auf die Proteinmenge zu beziehen und mit den gemessenen spezifischen Aktivitäten in Verbindung zu bringen. Für den Phenylalanin-Abbau wurde anhand der gegebenen Verdopplungszeiten q_{Phe} als 11 bzw. 6 nmol ($\text{min mg Protein}^{-1}$) und für die Nitrat-Reduktion q_{Nitrat} als 28 bzw. 15 nmol ($\text{min mg Protein}^{-1}$) berechnet. Diese spezifischen Aktivitäten müssten Enzyme, die an den entsprechenden Stoffwechselwegen beteiligt sind, mindestens erreichen, um das gemessene Wachstum zu ermöglichen.

1.2 Wachstum auf alternativen Substraten

Bisher wurden in dieser Arbeit nur Kulturen betrachtet, die mit Phenylalanin als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren. Als alternative Substrate wurden aber auch Phenylacetat oder Benzoat eingesetzt. Phenylacetat wurde ausgewählt, da es das Katalyseprodukt von AOR und PDH ist und somit ein Zwischenprodukt im anaeroben Phenylalanin-Metabolismus darstellt, zu dessen Abbau die Aktivitäten von AOR und PDH nicht benötigt werden. Benzoat wurde als einfache aromatische Verbindung gewählt, für deren Umwandlung zum zentralen Intermediat des anaeroben Aromatenstoffwechsels, Benzoyl-CoA, nur die Aktivität eines Enzyms benötigt wird (Benzoat-Coenzym A-Ligase; Rabus et al, 2005). Die beobachteten Wachstumsraten waren vergleichbar mit denen von Phenylalanin-Kulturen (s. Ergebnisse, Teil 1). Allerdings erreichten die Kulturen mit den alternativen C-Quellen etwas höhere Zelldichten mit der gleichen eingesetzten Stoffmenge. Kulturen mit Phenylacetat erreichten 119 % der Zelldichte in Phenylalanin-Kulturen und Kulturen mit Benzoat erreichten sogar 131 % (Daten nicht gezeigt).

1.3 Inhibition des Wachstums von *A. aromaticum* durch Wolfram

Am Anfang dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Phenylacetaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase des anaeroben Abbauwegs von Phenylalanin einen Wolfram-Cofaktor enthält. Daher wurde untersucht, ob die An- und Abwesenheit von Wolfram im Medium bzw. verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Metalls Auswirkungen auf das anaerobe Wachstum von *A. aromaticum* mit Phenylalanin haben. Im Standard-Mineralsalzmedium, das für *A. aromaticum* verwendet wird, sind 18 nM Wolframat und 148 nM Molybdat enthalten. Mit Medium ohne Wolframat wurden bezüglich des Wachstums keine Unterschiede festgestellt im Vergleich zu Medium mit 18 nM W. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass durch Verunreinigungen in den anderen Medienbestandteilen trotzdem ausreichend Wolfram enthalten war, um aktive AOR herzustellen. Wenn hingegen Wolframat-Konzentrationen von 1 µM und höher eingesetzt wurden, während die Molybdat-Konzentration gleich blieb, wurde beobachtet, dass die *A. aromaticum*-Kulturen langsamer wuchsen. Kulturen mit wenig Wolfram (nicht oder mit 18 nM Wolframat supplementiert) wuchsen mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von 17 h. Mit Medium, das 1 µM Wolframat enthielt, erhöhte sich die Verdopplungszeit um über 30 % auf 22,3 h. Waren 10 µM Wolframat im Medium enthalten, lag die Verdopplungszeit sogar bei mehr als 31 h. Diese Daten spiegeln auch die Ergebnisse, die in Debnar-Daumler et al (2014) präsentiert wurden, wider. Eine leichte Inhibition wurde mit 1 µM Wolframat und eine starke Inhibition mit 10 µM Wolframat beobachtet, wenn das Wachstumsmedium zusätzlich Molybdat enthielt. Eine vollständige Inhibition wurde mit ca.

50 μM Wolframat erzielt. Da mit steigender Wolframat-Konzentration im Medium der Nitratverbrauch abnahm, ist es wahrscheinlich, dass das Wachstum der Kulturen inhibiert wurde, indem Wolfram unspezifisch in das aktive Zentrum der Nitrat-Reduktase eingebaut wurde. Die Nitrat-Reduktase ist ein Molybdän-Enzym der DMSO-Reduktase-Familie und katalysiert den ersten Schritt der Denitrifikation. Dieses Enzym ist essentiell für das denitrifizierende Wachstum von *A. aromaticum* (siehe auch Diskussion, Kapitel 2).

1.4 Enzymaktivitäten in verschiedenen Kulturen von *A. aromaticum*

1.4.1 Der Einfluss von alternativen C-Quellen auf Enzymaktivitäten in Zellextrakten

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils wurden alle Ergebnisse auf Kulturen bezogen, die auf Phenylalanin als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren. Zusätzlich wurden aber auch alternative Substrate eingesetzt. Für diese Kulturen wurden entweder Phenyllessigsäure oder Benzoat als einzige Kohlenstoffquellen verwendet. Diese Kulturen sollten einen ersten Hinweis darauf liefern, welches Phenylacetaldehyd-oxidierende Enzym spezifisch für den Phenylalanin-Stoffwechsel ist. Die Erwartung war, dass ein spezifisches Enzym in Kulturen mit Phenyllessigsäure oder Benzoat nach unten reguliert wird und deswegen weniger Aktivität in entsprechenden Zellextrakten messbar sein sollte. Phenylacetaldehyd-oxidierende Aktivitäten wurden in Extrakten von Kulturen gemessen, die entweder über drei oder über neun Passagen (Überimpfungen in frisches Medium) an die Kohlenstoffquellen Phenylalanin, Phenyllessigsäure oder Benzoat adaptiert worden waren. Die jeweils erste Passage wurde aus Ethylbenzol-adaptierten Kulturen beimpft.

Die mit Benzylviologen gemessene Aktivität der AOR veränderte sich wenig oder gar nicht zwischen den verschiedenen Adaptionszeiten, zeigte aber Unterschiede in Bezug auf die Kohlenstoffquellen (Abbildung 6). In den Kulturen mit Phenyllessigsäure war die Aktivität am niedrigsten (6 mU/mg), während sie in den Kulturen mit Benzoat zwischen 25 und 38 mU/mg lag und damit am höchsten war. Die NAD(P)-abhängigen Aktivitäten veränderten sich hingegen stark von der kurzen zur langen Adaptionszeit. In der dritten Passage waren die jeweiligen Aktivitäten unabhängig von der Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium auf dem gleichen Niveau (NAD, 80 mU/mg; NADP, 130 mU/mg). In der neunten Passage waren die NAD-abhängigen Aktivitäten in den Phenylalanin- und Benzoat-Kulturen gleich (12 mU/mg), in den Phenyllessigsäure-Kulturen aber ungefähr doppelt so hoch (27 mU/mg). Die NADP-abhängigen Aktivitäten waren in der neunten Passage in den Phenylalanin-Kulturen mit 69 mU/mg am höchsten und in den Benzoat-Kulturen mit 9 mU/mg am niedrigsten.

Die ursprüngliche Erwartung konnte durch dieses Experiment weder eindeutig belegt noch widerlegt werden. Die Dehydrogenase-Aktivitäten veränderten sich zwar stark zwischen den Adaptionszeiten, was darauf schließen lässt, dass der Stoffwechsel nach der dritten Passage noch nicht vollständig an das neue Substrat (Phenylalanin) angepasst war; doch lediglich bei den Messungen mit NADP deutete sich eine Spezifität für den Phenylalanin-Stoffwechsel an. Die Aktivitäten der AOR in diesem Experiment lassen eher auf eine Wachstumssubstrat-unspezifische Induktion schließen, wie es in Debnar-Daumler et al (2014) postuliert ist.

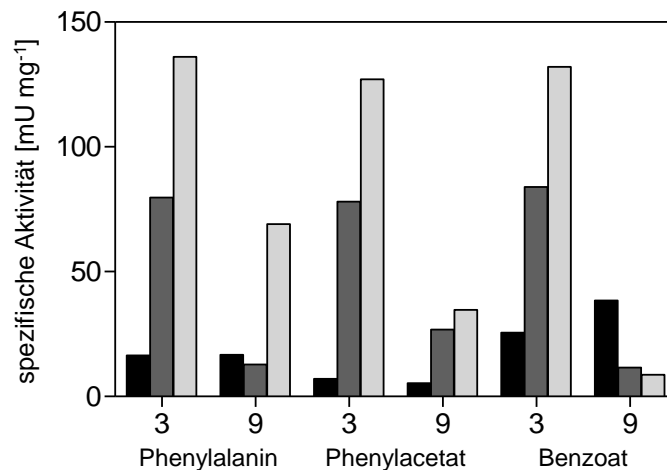


Abbildung 6. Phenylacetaldehyd-oxidierende Enzymaktivitäten in Extrakten von *A. aromaticum*-Zellen denitrifizierendem Wachstum auf verschiedenen C-Quellen. Die Kulturen waren jeweils über drei oder neun Passagen an die C-Quelle adaptiert worden. Spezifische Aktivitäten der AOR (**schwarz**), der Dehydrogenase gemessen mit NAD (**dunkelgrau**) und der Dehydrogenase gemessen mit NADP (**hellgrau**) sind in mU mg⁻¹ angegeben.

1.4.2 Der Einfluss von Molybdän und Wolfram auf den Abbau von Phenylalanin

Wie in Debnar-Daumler et al (2014) beschrieben, wurde der Einfluss verschiedener Molybdän- und Wolfram-Konzentrationen auf das Wachstum von *A. aromaticum* auf Phenylalanin und auf dabei produzierte Enzyme untersucht. Zunächst wurde das Medium mit deionisiertem Wasser (0,1-0,5 μ S/cm) in gebrauchten, gespülten Kulturflaschen angesetzt und Molybdat in Konzentrationen zwischen 0 und 148 nM und Wolframat in Konzentrationen zwischen 0 und 200 nM hinzugefügt. Das Medium wurde aus einer Phenylalanin-adaptierten *A. aromaticum*-Kultur angeimpft. In Bezug auf das Wachstum konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen festgestellt werden. Daher wurden im Anschluss neue Kulturen in fabrikneuen Flaschen mit Reinstwasser (0,05 μ S/cm) angesetzt und Molybdat (99,9 %) und Wolframat (99,995 %) aus frisch geöffneten Chemikalienbehältern entnommen, um mögliche Kontaminationen zu reduzieren. Dieser zweite Versuch wurde in Debnar-Daumler et al (2014)

ausgewertet und diskutiert. Die Ergebnisse des ersten Versuchs (mit deionisiertem Wasser) werden im Folgenden beschrieben und sind in Abbildung 7 dargestellt.

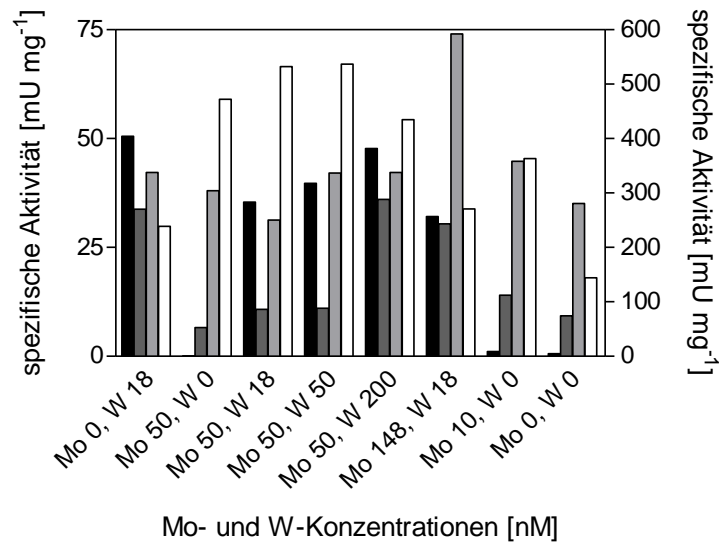


Abbildung 7. Phenylacetaldehyd-oxidierende Enzymaktivitäten in Extrakten von *A. aromaticum*-Zellen, die denitrifizierend mit verschiedenen Molybdat- und Wolframatkonzentrationen auf Phenylalanin gewachsen waren. Spezifische Aktivitäten der AOR (linke y-Achse, **schwarz**), der Dehydrogenase gemessen mit NAD (linke y-Achse, **dunkelgrau**), der Dehydrogenase gemessen mit NADP (linke y-Achse, **hellgrau**) und der Nar (rechte y-Achse, **weiß**).

Die Aktivitäten der Nitrat-Reduktase (Nar), der Phenylacetaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) und der NAD(P)-abhängigen Dehydrogenase(n) wurden in Extrakten gemessen, die durch Zentrifugation der Zelllysate bei $17.000 \times g$ hergestellt worden waren. In diesen Extrakten verbleibt die Membran-gebundene Nar im Überstand. Auch in diesem Experiment war die Nar-Aktivität im Extrakt der Kultur ohne Mo und W geringer als in den Extrakten mit Supplementation. In den Extrakten aus Kulturen mit Supplementation eines oder beider Oxoanionen variierte die Nar-Aktivität scheinbar unabhängig von der zugesetzten Molybdat-Menge, sodass das Experiment möglicherweise mit anderen Molybdat- und Wolframat-Konzentrationen wiederholt werden müsste, um eine eindeutige Aussage über den Metallgehalt der Nitrat-Reduktase treffen zu können. Bezogen auf die Aktivität der AOR können die gleichen Rückschlüsse gezogen werden, wie für den Versuch, der in Debnar-Daumler et al (2014) beschrieben wurde. Auch dort war in den Kulturen ohne Wolframat-Zugabe nahezu keine AOR-Aktivität messbar. Wurde das Medium hingegen mit Wolframat versetzt, wurden in Kulturen mit deionisiertem Wasser Aktivitäten zwischen 32 und 51 mU/mg gemessen, sodass auch dieser Versuchsaufbau darauf hindeutet, dass die AOR einen Wolfram-Cofaktor enthält. Von den beiden Dehydrogenase-Aktivitäten war in diesem Experiment immer mindestens eine hoch genug um die beobachtete Wachstumsrate der

Kulturen auf Phenylalanin zu ermöglichen. Ein eindeutiger Zusammenhang der gemessenen Dehydrogenase-Aktivitäten mit den hier variierten Bedingungen wurde erwartungsgemäß nicht festgestellt.

2 Enzymreinigungen

In Extrakten von *A. aromaticum*-Zellen, die anaerob auf Phenylalanin gewachsen waren, konnten immer drei Phenylacetaldehyd-oxidierende Aktivitäten mit Benzylviologen (AOR-Aktivität), NAD und NADP (Dehydrogenase-Aktivitäten oder Aktivität der Ferredoxin:NADH-Oxidoreduktase aus dem postulierten *aor*-Operon) gemessen werden. Durch Reinigung der entsprechenden Enzyme aus Zellextrakten sollten sie für die weitere Analyse zugänglich gemacht werden. Im ersten Abschnitt der Ergebnisse wurden schon die jeweils besten Anreicherungsstrategien dargestellt. Besonders die AOR konnte aber nicht vollständig aufgereinigt werden, da ihre Aktivität bereits in den Zellen aus dem Fermenter sehr gering war und die bekannten Reinigungsprotokolle von archaeeellen AORs nicht zum Erfolg führten. Deshalb wird in den folgenden Abschnitten kurz dargestellt wie die Anreicherungsstrategien aus der Publikation zustande kamen und welche weiteren Ergebnisse daraus resultierten. Die AOR sollte vorrangig aufgereinigt werden, um bestimmen zu können, welches Metall sie tatsächlich enthält. Dabei wurden native Reinigungsmöglichkeiten eingesetzt, da ich schon zuvor gezeigt worden war, dass die AOR in *Escherichia coli* nicht heterolog produziert werden konnte (Debnar-Daumler, 2009). Die NAD(P)-abhängigen Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten sollten angereichert werden, um das Gen oder die verantwortlichen Gene zu identifizieren. Einige Vorversuche zu den beschriebenen Reinigungsansätzen wurden bereits zuvor durchgeführt (Debnar-Daumler, 2009), deren Ergebnisse an den entsprechenden Stellen im folgenden Text zusammengefasst werden. Für alle Anreicherungsschritte wurden *A. aromaticum*-Zellen aus dem oben beschriebenen Fermenter verwendet. Die Zellen wurden mit der French Press lysiert und die Extrakte durch Zentrifugation für 1 h bei 4°C und $100.000 \times g$ hergestellt.

2.1 Trennung der Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten mittels

Chromatographie an DEAE-Sepharose

Als erster Schritt bei der Anreicherung der Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten aus Zellextrakten wurde immer die Chromatographie an DEAE (Diethylaminoethyl)-Sepharose gewählt. Diese Methode zum Anionenaustausch hat sich in verschiedenen Enzymreinigungs-Protokollen als Start bewährt (Hagedoorn et al, 2005; Mohamed & Fuchs, 1993; Roy et al, 1999). Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente sind in Tabelle 17 für alle drei betrachteten Aktivitäten zusammengefasst und anhand der verwendeten Elektronenakzeptoren sortiert. Die Chromatographie mit einer DEAE-Säule aus Debnar-Daumler (2009) wurde hier ebenfalls mit aufgenommen. Die Abhängigkeit der AOR-Aktivität vom pH-Wert wurde im Zellextrakt

untersucht. Im Bereich von pH 5 bis pH 10 wurden keine deutlichen Unterschiede in der Aktivität festgestellt (s. Abbildung 16 im Anhang), sodass Reinigungsschritte bei verschiedenen pH-Werten versucht werden konnten. Bei allen Experimenten wurden die beiden NAD(P)-abhängigen Aktivitäten während des ersten Chromatographie-Schritts von der AOR-Aktivität getrennt. In den Fraktionen mit AOR-Aktivität wurde keine NAD(P)-reduzierende Aktivität gefunden. Folglich bildet die AOR keinen stabilen Komplex mit dem benachbart codierten Ferredoxin und der Ferredoxin:NADH-Oxidoreduktase. Die Aktivitäten mit NAD und NADP wurden immer in demselben Peak gefunden und eluierten bei geringeren Konzentrationen des Eluenten als die AOR (Abbildung 8). Dies deutet bereits darauf hin, dass beide Reaktionen von nur einem Enzym katalysiert werden. Die in Tabelle 17 dargestellten Versuche lassen sich so zusammenfassen, dass die Chromatographie-Schritte bei pH 6,0 besser funktioniert haben als bei den pH-Werten 7,5 und 8,0. Des Weiteren scheint KCl ein besser geeignetes Elutionsmittel zu sein als NaCl und NH_4Cl . In zwei von drei Versuchen wurde die AOR-Aktivität mit MES-Puffer besser angereichert als mit Kaliumphosphat-Puffer. Diese Abhängigkeit war bei den NAD(P)-abhängigen Aktivitäten nicht zu beobachten. Der letzte Chromatographie-Versuch (Nr. 10 in Tabelle 17) lieferte in Bezug auf die AOR-Aktivität das beste Ergebnis und ist identisch mit dem ersten Schritt in der oben beschriebenen Anreicherungs-Strategie, sowohl für die AOR als auch für die NAD(P)-abhängigen Aktivitäten.

Tabelle 17. Anreicherungen der Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten aus Extrakten von *A. aromaticum*-Zellen mit Chromatographie an einer DEAE-Sepharose-Säule. Anreicherung im Vergleich zum Extrakt (1-fach) und Ausbeute als Teil der Gesamtaktivität im jeweiligen Extrakt (100 %). BV=Benzylviologen

Nr.	Puffer	pH	Elutionsmittel	Anreicherung [fach]			Ausbeute [%]		
				BV	NAD	NADP	BV	NAD	NADP
1*	Tris	8,0	NaCl	6	0,5	0,6	36	8	9
2	Tris	8,0	NaCl	5	0,3	0,5	99	10	19
3	HEPES	7,5	NH_4Cl	0	2,4	5,1	12	12	26
4	HEPES	7,5	NH_4Cl	2	0,3	0,3	10	7	7
5	KPP	6,0	KCl	16	14	11	25	69	55
6	KPP	6,0	KCl	9	5,9	3,5	90	119	71
7	KPP	6,0	KCl	46	37	16	119	204	86
8	MES	6,0	KCl	75	13	5,4	175	115	50
9	MES	6,0	KCl	37	14	11	58	91	71
10	MES	6,0	KCl	135	22	16	205	120	91

*Ergebnis aus Masterarbeit (Debnar-Daumler, 2009).

Exemplarisch zeigt Abbildung 8 das Chromatogramm dieses Schritts. Darin ist die Trennung der AOR- und Dehydrogenase-Aktivitäten voneinander deutlich zu erkennen.

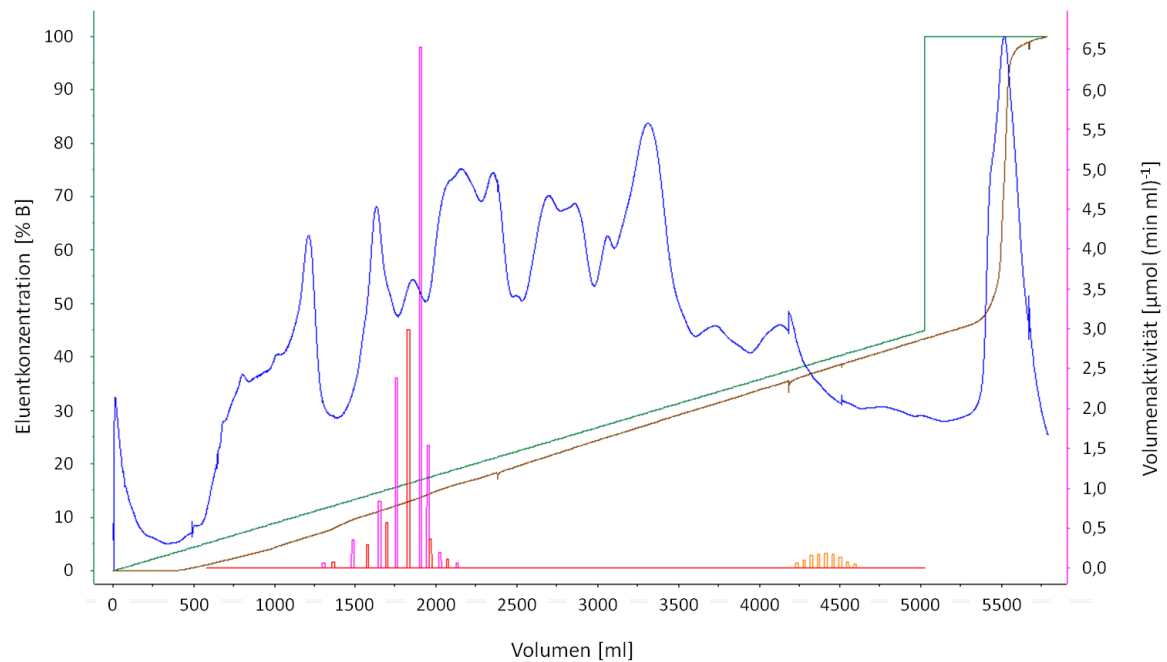


Abbildung 8. Anreicherung der drei Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten aus Extrakt von *A. aromaticum*-Zellen, die anaerob auf Phenylalanin gewachsen waren. Die KCl-Konzentration im Puffer B betrug 1 M. Der Gradient erstreckte sich über 10 Säulenvolumen, die in Fraktionen von 15 ml gesammelt wurden. **(Blau)** UV-Absorption bei 280 nm (90-2800 mAU), **(grün)** Eluentkonzentration in % Puffer B, **(braun)** Leitfähigkeit der flüssigen Phase nach der Säule, **(rot)** NAD-abhängige Phenylacetaldehyd-oxidierende Volumenaktivität, **(violett)** NADP-abhängige Phenylacetaldehyd-oxidierende Volumenaktivität, **(orange)** AOR-Volumenaktivität.

2.2 Anreicherung der AOR

Die AOR-Aktivitätspools nach den Chromatographien an DEAE-Sepharose wurden genutzt, um verschiedenste andere Anreicherungsverfahren auszuprobieren, die zu homogen aufgereinigtem Enzym führen könnten. Die Pools wurden über 30 kDa-Filter (Amicon-Rührzelle) unter anoxischen Bedingungen konzentriert. Anreicherungsfaktor und Ausbeute wurden dabei nicht signifikant verändert und im Durchlauf wurde keine AOR-Aktivität gefunden. Dialyse als Methode zur Entsalzung der AOR-Pools hatte allerdings den gegenteiligen Effekt, da sie die vorher erzielte Anreicherung deutlich herabsetzte und die AOR teilweise inaktivierte. In Reinigungs-Protokollen von AORs aus hyperthermophilen Archaea hat sich die Chromatographie an keramischen Hydroxyapatit-Säulen bewährt (Hagedoorn et al, 2005; Heider et al, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde aber festgestellt, dass eine Bindung der *A. aromaticum*-AOR nicht an dieses Säulenmaterial nicht erfolgte. Auch durch vorhergehende Dialyse oder Verdünnung der Proteinprobe mit salzarmem Puffer konnte die AOR nicht an Hydroxyapatit gebunden werden. Verschiedene Puffer und Pufferkonzentrationen hatten ebenfalls keinen positiven Einfluss.

Als alternativer zweiter Schritt nach der DEAE-Chromatographie wurden verschiedene Anionenaustauscher unter diversen Bedingungen getestet. Weder eine erneute Chromatographie an DEAE-Sepharose bei verschiedenen pH-Werten noch die Verwendung der Anionenaustauscher Q-Sepharose-, Resource Q- oder Capto Q konnten die AOR jedoch weiter anreichern. Als weiteres Proteinreinigungs-Prinzip wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie getestet. Das antichaotrope Salz Ammoniumsulfat sollte hierbei die hydrophoben Oberflächenbereiche der Proteine freilegen, damit sie an das Säulenmaterial binden können. Ein Vorversuch zu dieser Methode wurde bereits in Debnar-Daumler (2009) beschrieben. Bei dieser Ammoniumsulfat-Präzipitation fiel die AOR bei 30 % Sättigung (1,3 M) mit dem Salz aus. Die AOR-Aktivität konnte durch Lösen in Puffer aber nicht vollständig wiederhergestellt werden. Während der Arbeiten zur Promotion wurden AOR-Aktivitätspools mit 0,5 und 1 M Ammoniumsulfat versetzt. Bei beiden Konzentrationen blieb die Aktivität größtenteils erhalten, die AOR band aber nicht an das Säulenmaterial (Phenylsepharose) und wurde nicht angereichert. Folglich konnte auch diese Methode nicht weiter verfolgt werden. Als einziger hilfreicher Schritt, zusätzlich zur DEAE-Chromatographie, stellte sich die Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie) heraus. Das beste Experiment mit dieser Methode wurde bereits in Debnar-Daumler et al (2014) in der Reinigungstabelle (Table 3) und der SDS-PAGE-Analyse (Fig. 3) gezeigt. Das Chromatogramm dieses Versuchs ist im Anhang dargestellt (Abbildung 17). Dieses zeigt deutlich, dass noch einige andere Proteine die Probe verunreinigten, sodass der AOR-Aktivität kein eindeutiger UV-Peak zugeordnet werden konnte. Dadurch war auch eine Größenabschätzung durch diese Methode nicht möglich.

2.2.1 Klonierung des *aor*-Gens für die homologe Überexpression

Für eine homologe Überproduktion der Phenylacetaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) in *Aromatoleum aromaticum* wurde das entsprechende Gen *ebA5005* (*aor*) in die Broad-host-range-Vektoren pASG3_Mod⁻ (ohne zusätzlichen *E. coli*-ori) und pASG3_Mod⁺ (mit zusätzlichem *E. coli*-ori) kloniert, die beide einen Strep-Tag am 3'-Ende des Zielgens vermitteln (Abbildung 9). Beide Vektoren enthalten eine sogenannte Mob-site, die den Plasmidtransfer durch Konjugation von *E. coli*-Stämmen mit *A. aromaticum* ermöglicht. Diese *E. coli*-Stämme (z. B. *E. coli* S17-1, *E. coli* SM10) müssen die Transfer (*tra*)-Funktionen des Konjugationselements RP4 in ihrem Genom enthalten. Außerdem umfasst die Mob-site einen Broad-host-range-ori, der sowohl von *A. aromaticum* als auch von *E. coli* erkannt wird. Als Template für die Amplifizierung des *aor*-Gens diente chromosomale DNA von *A. aromaticum*. Das PCR-Fragment wurde zunächst in den Vektor pEntry-IBA20 kloniert. Anschließend wurde es durch Restriktion mit dem Seitenschneider-Enzym *Esp3I* und erneute Ligation in die entsprechenden Expressionsvektoren übertragen (s. Material

und Methoden, Kapitel 2, 4.7). Dabei wurden nicht nur die in Abbildung 9 gezeigten Expressionsvektoren verwendet, sondern auch die Derivate pASG5_Mod⁻ und pASG5_Mod⁺, die sich von den in Abbildung 9 gezeigten Vektoren lediglich durch Lokalisation des Strep-Tags am 5'-Ende des klonierten Gens unterscheiden. Die resultierten Plasmide wurden zwar erfolgreich hergestellt, im Rahmen dieser Arbeit aber noch nicht für die Expression verwendet.

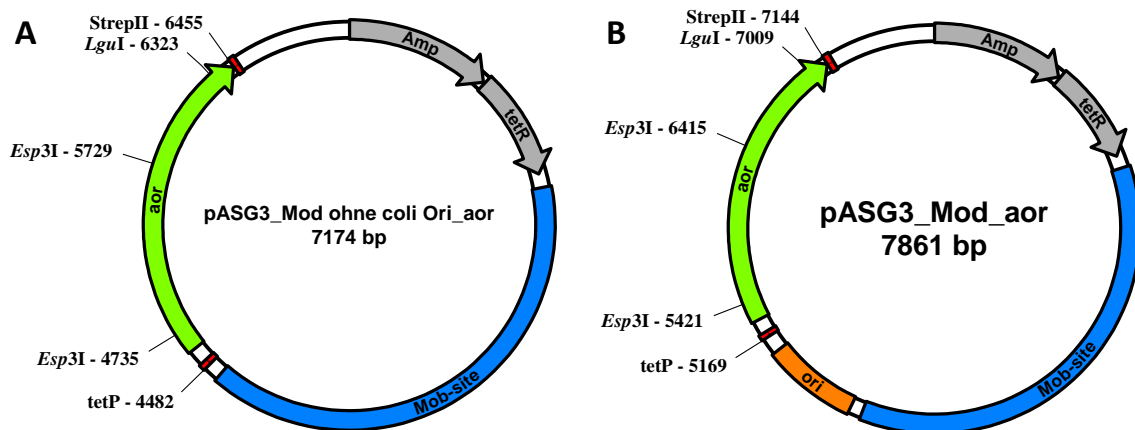


Abbildung 9. Broad-host-range-Expressionsvektoren für die Produktion der Phenylacetaldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR). Das *aor*-Gen (grün) steht unter der Kontrolle eines Anhydrotetracyclin-induzierbaren Promotors. Die AOR wird als Fusionsprotein mit C-terminalem Strep-Tag produziert. **(A)** Expressionsvektor mit einem broad-host-range origin of replication in der Mob-site (blau), die die Mobilisierung des Vektors während der Konjugation zwischen *E. coli* und *A. aromaticum* ermöglicht. **(B)** Expressionsvektor mit einem zusätzlich für *E. coli* optimierten origin of replication (orange).

2.3 Anreicherung des NAD(P)-abhängigen Enzyms

Bei der Anreicherung der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase, die bereits in Debnar-Daumler et al (2014) beschrieben wurde, wurden wie auch bei der Anreicherung der AOR noch weitere Reinigungsschritte getestet, um ein besseres Ergebnis zu erzielen. Dazu zählt die Chromatographie an Blue-Sepharose, keramischem Hydroxyapatit oder Phenylsepharose. Zur Umpufferung der Fraktionen wurde dialysiert, die Konzentration von aktiven Pools erfolgte durch Ultrafiltration mittels einer Amicon-Rührzelle (Ausschlussgröße 30 kDa). Diese Schritte wirkten sich allerdings entweder gar nicht oder sogar negativ auf den Reinigungserfolg aus. Die Chromatographie an einer Butylsepharose-Säule war hingegen hilfreich in der Anreicherung der NAD(P)-abhängigen Enzymaktivitäten. In einem Vorversuch zu der in Debnar-Daumler et al (2014) beschriebenen Anreicherungsstrategie wurden durch eine Chromatographie an Butylsepharose zwei Proteine deutlich angereichert (Abbildung 10). Eines davon wurde am Fachbereich Chemie

durch Dr. Uwe Linne mittels Massenspektrometrie als Phenylpyruvat-Decarboxylase identifiziert. Diese wird durch das Gen *ebA6545* codiert, katalysiert die Decarboxylierung von Phenylpyruvat zu Phenylacetaldehyd im Phenylalanin-Stoffwechsel und stellt folglich das Substrat von PDH und AOR bereit (vgl. Einleitung, Kapitel 2).

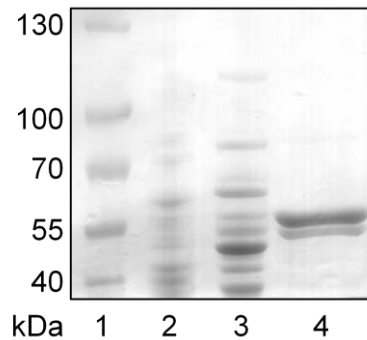


Abbildung 10. SDS-PAGE-Analyse der Anreicherung der NAD(P)-abhängigen Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten. Ein 8%iges Acrylamidgel wurde verwendet und pro Spur 15 µg Protein aufgetragen. **(1)** Marker (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder), **(2)** Extrakt von *A. aromaticum*-Zellen, anaerob auf Phenylalanin gewachsen, **(3)** aktive Fraktionen nach Chromatographie an DEAE-Sephrose, **(4)** aktive Fraktionen nach Chromatographie an Butylsepharose. Die obere Bande in Spur 4 wurde durch Massenspektrometrie als Pdc (codiert durch Gen *ebA6545*) identifiziert.

Die PDH-Aktivitäten mit NAD bzw. NADP waren in dem untersuchten Pool stark angereichert (Tabelle 18). Folglich könnte die zweite Bande im Polyacrylamidgel die später identifizierte PDH repräsentieren, da sie auch auf der erwarteten Höhe im Gel zu sehen ist. Obwohl dies nicht überprüft wurde, könnte man spekulieren, dass eine lockere Komplexbildung der beiden am Phenylalanin-Abbau beteiligten Enzyme vorliegt. Unwahrscheinlich ist hingegen, dass auch die Pdc auch die Oxidation von Phenylacetaldehyd katalysiert.

Tabelle 18. Anreicherungstabellen der Phenylacetaldehyd-oxidierenden Aktivitäten mit **(A)** NAD und **(B)** NADP als Coenzym.

A	Aktivität [U]	Protein [mg]	Spezifische Aktivität [mU mg ⁻¹]	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
Extrakt	3,7	300	12	1	100
DEAE-Sepharose	8,0	16	490	40	220
Butylsepharose	0,9	0,6	1400	115	25

B	Aktivität [U]	Protein [mg]	Spezifische Aktivität [mU mg ⁻¹]	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
Extrakt	20	300	67	1	100
DEAE-Sepharose	17	16	1100	16	86
Butylsepharose	2,7	0,6	4200	62	13

Die in Debnar-Daumler et al (2014) beschriebene Anreicherung der PDH wurde mit denselben Säulen durchgeführt wie die, die zur Identifikation der Pdc führte, enthielt aber als zusätzlichen dritten Chromatographieschritt eine Gelfiltration (Superdex 75 prep grade). Die Chromatogramme der beiden letzten Schritte sind im Anhang dargestellt (Abbildung 18 und Abbildung 19). Die sich ergebenden geringen Ausbeuten der Gesamtaktivitäten, waren wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Aktivitäten bei der Butylsepharose-Chromatographie über alle Elutionsschritte verteilt waren und nur die aktivsten Fraktionen ausgewählt wurden. Außerdem wurde auch nur die aktivste von drei Fraktionen nach der Gelfiltration berücksichtigt. Schätzt man den Anteil der PDH im Polyacrylamidgel (Fig. S2 in Debnar-Daumler et al (2014)) auf 75 % und verwendet die beiden Werte der angereicherten NAD- und NADP-abhängigen Aktivitäten für die Ausbeute, ergibt sich ein Anteil der PDH am Gesamtprotein im eingesetzten Extrakt von ca. 0,8 % lag.

2.4 Rekombinante Reinigung der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase

Wie im ersten Abschnitt der Ergebnisse und in Material und Methoden beschrieben, wurde das Gen der PDH mit dem Stargate-System kloniert und in *E. coli* Dh5 α exprimiert. Die Reinigung erfolgte über den N-terminal fusionierten Strep-Tag an einer Strep-Tactin-Säule. Anschließend wurden keine Verunreinigungen auf einem mit Brillant Blau R 250 gefärbten Polyacrylamid-Gel mehr detektiert (Abbildung 11). Zusätzlich zu den in Debnar-Daumler et al (2014) beschriebenen Charakterisierungen wurden weitere Experimente mit der rekombinanten PDH durchgeführt, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

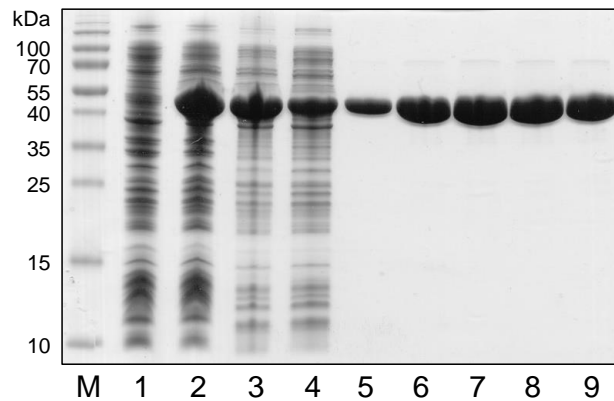


Abbildung 11. SDS-PAGE-Analyse der Reinigung der in *E. coli* Dh5 α rekombinant produzierten PDH an einer Strep-Tactin-Säule. Ein 15 %iges Polyacrylamidgel wurde verwendet. **(M)** Marker (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder), **(1)** Zellen vor der Induktion, **(2)** Zellen nach 3 h Induktion, **(3)** Extrakt nach Aufschluss mit Ultraschall (25 μ g Protein), **(4)** Durchlauf der Säule (25 μ g Protein), **(5-9)** aufeinanderfolgende Elutionsfraktionen (je 5 μ l aufgetragen).

2.4.1 Lagerung und Verdünnung der rekombinanten PDH

Frisch gereinigte rekombinante PDH wurde routinemäßig mit 10 % Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert. Wurde die Proteinlösung nach dem Auftauen mit Puffer verdünnt, verlor sie innerhalb kürzester Zeit (10-20 min) bis zu 80 % der mit NAD gemessenen Aktivität. Daher wurden verschiedene Pufferzusätze ausprobiert, die das Enzym und damit die Aktivität stabilisieren könnten. Dabei wurde versucht, den Effekt des sogenannten Macromolecular Crowding (Zhou et al, 2008) durch bovines Serumalbumin (BSA) und Polyethylenglycol 400 (PEG 400) hervorzurufen. Außerdem wurde das Enzym durch Glycerin stabilisiert. Die PDH konnte auch über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden, wenn sie mit 50 % (vol/vol) Glycerin versetzt wurde, ohne an Aktivität zu verlieren (Abbildung 12). Das Gleiche wurde beobachtet, wenn die Enzymlösung 1:10 mit 40 % PEG 400 in 100 mM HEPPS/KOH (pH 8,5) verdünnt wurde. Die mit NAD gemessene Aktivität stieg bei dieser Behandlung sogar um ca. 50 % an. Wurde die PDH mit Lösungen von 50 % Glycerin in Puffer oder 100 μ g BSA/ml Puffer verdünnt, verringerte sich die Aktivität. Folglich wurde ein Arbeitsaliquot der PDH mit 50 % Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Für Enzymaktivitätsassays wurde aus diesem Aliquot eine Portion mit 40 % PEG 400 auf die gewünschte Verdünnung gebracht. Diese so behandelte Probe konnte sogar über Nacht auf Eis bei 4°C gelagert werden, ohne an Aktivität zu verlieren.

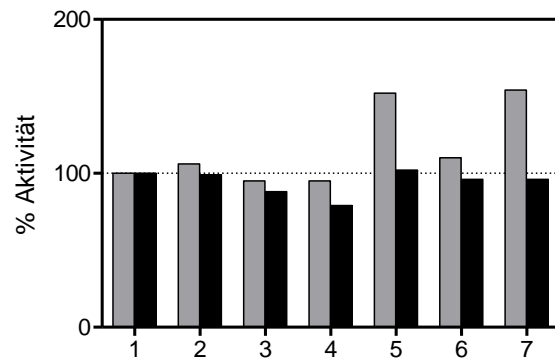


Abbildung 12. Aktivitäten der rekombinanten PDH gemessen mit NAD (**grau**) und NADP (**schwarz**) als Coenzym. Die Aktivitäten wurden ins Verhältnis zur unverdünnten PDH gesetzt (**1**). 100 % entsprechen 5,6 U/mg, gemessen mit NAD und 5,0 U/mg, gemessen mit NADP. Die Aktivitäten wurden gemessen nachdem das Enzym wie folgt verdünnt worden war: (**1**) unverdünnte PDH, frisch aufgetaut, (**2**) eingestellt auf 50 % Glycerin, (**3**) eingestellt auf 5 % Glycerin, (**4**) mit 10 µg BSA/ml versetzt, (**5**) eingestellt auf 4 % PEG 400, (**6**) wie 2, nach fünf Tagen Lagerung bei -20°C, (**7**) wie 5, nach fünf Tagen Lagerung bei -20°C.

3 Geplante Experimente

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bereits einige Experimente geplant und vorbereitet, die auf den zwei wichtigsten hier gewonnenen Erkenntnissen aufbauen. Die erste Erkenntnis ist, dass *A. aromaticum* Molybdän- und Wolframenzyme zur selben Zeit produziert. Daher wurde das Genom von *A. aromaticum* auf Gene untersucht, die die Differenzierung und Regulation zwischen diesen beiden sehr ähnlichen Metallen ermöglichen könnten (s. Debnar-Daumler et al, 2014). Dabei wurden zwei unterschiedliche Oxoanionen-Transporter gefunden, von denen einer spezifisch für Molybdat und der andere spezifisch für Wolframat sein könnte. Um dies zu zeigen, sollten die beiden entsprechenden periplasmatischen Bindeproteine, ModA (*ebA2721*) und TupA (*ebA3597*), heterolog produziert, gereinigt und anschließend auf ihre Affinität gegenüber verschiedenen Oxoanionen überprüft werden. Außerdem sollten ihre Gene einzeln in *A. aromaticum* SR7 deletiert werden. Zusätzlich wurde auch die Deletion des *moeA1*-Gens (*ebA6673*), dessen Produkt Molybdän oder Wolfram auf den entsprechenden Cofaktor überträgt, bereits geplant und vorbereitet. Die zweite Erkenntnis ist, dass, entgegen der Annahmen vor Beginn dieser Arbeit, die PDH spezifisch für den Phenylalanin-Metabolismus zu sein scheint, während die AOR vermutlich überschüssige Aldehyde detoxifiziert. Daher wurden Knock-out-Experimente der beiden entsprechenden Gene geplant und so angelegt, dass die Gene sowohl separat als auch gleichzeitig deletiert werden können.

3.1 Knock-out-Mutationen

Die Strategie zur Herstellung von Knock-out-Mutationen der Gene *ebA2721*, *ebA3597*, *ebA4954*, *ebA5005* und *ebA6673* in *A. aromaticum* wurde an die bereits beschriebenen Deletionen des *ebdC2*-Gens in *A. aromaticum* (Wöhlbrand & Rabus, 2009) und des *pkaC*-Gens in *Dictyostelium discoideum* (Kuwayama et al, 2002) angelehnt. Diese Strategie beinhaltet die Herstellung eines Knock-out-Konstrukts durch PCR und das Klonieren dieses Konstrukts in den mobilisierbaren Vektor pK19mobsacB (Schäfer et al, 1994). Das Knock-out-Konstrukt besteht aus drei Teilen, den beiden flankierenden Regionen des zu deletierenden Gens und einer Antibiotika-Resistenzkassette zur Selektion der Deletionsmutanten. Alle drei Teile wurden mittels PCR einzeln amplifiziert und anschließend durch Fusions-PCR (Kuwayama et al, 2002) miteinander verbunden. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 3 (S. 27) aufgelistet. Nach der Konjugation in den Zielorganismus wird das Konstrukt durch homologe Rekombination in das Genom integriert.

Als homologe Flanken wurden jeweils ca. 1000 bp vor und nach dem zu deletierenden Gen amplifiziert. Die entsprechenden Primer wurden wie folgt abgeleitet. Primer 1 und 2 bildeten das

Paar zur Amplifikation der upstream-Flanke. Primer 1 lag ca. 1000 bp aufwärts vom Startcodon des Zielgens. Zusätzlich wurden an sein 5'-Ende die Restriktionssequenz für die Endonuklease XbaI und zwei weitere Adenine angehängt. Die bindende Sequenz von Primer 2 schloss das Startcodon des Zielgens ein. Entsprechend wurden die Primer 3 und 4 für die Amplifikation der downstream-Flanke abgeleitet. Die bindende Sequenz von Primer 3 startete mit der ersten Base nach dem Stoppcodon des Zielgens.

Die Antibiotika-Resistenzkassette wurde mit den Primern 5 und 6 amplifiziert, deren bindende Sequenzen jeweils 30 nt lang waren. Primer 5 begann 201 bp upstream des Startcodons, während sich Primer 6 bis zum Stoppcodon des Resistenz-vermittelnden Gens erstreckte. Die Primer 2 und 3 wurden in 5'-Richtung um die komplementäre Sequenz der Primer 5 bzw. 6 verlängert und umgekehrt. Auf diese Weise entstanden bei der ersten PCR 30 nt lange Überhänge, die beim zweiten PCR-Schritt mit den drei Fragmenten und den Primern 1 und 4 die Fusion der drei Fragmente bewirkten. Als Resistenzkassette wurde standardmäßig das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*) aus dem Plasmid pACYC-Duet verwendet. Für das Knock-out-Konstrukt des Gens der PDH (*ebA4954*) wurde das Gen für die Gentamycin-Acetyltransferase aus dem Plasmid pBBR1MCS-5 verwendet. Dadurch sollte ermöglicht werden, die Gene für AOR und PDH gleichzeitig deletieren zu können.

Die fertigen Fusionsprodukte sollten über die XbaI-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pK19mobsacB kloniert und anschließend über Konjugation von *E. coli* in *A. aromaticum* SR7 transferiert werden. Dieser Vektor vermittelt Resistenz gegenüber Kanamycin und trägt das *sacB*-Gen, das die Levansucrase von *Bacillus subtilis* codiert. Es wurde beobachtet, dass die Produktion von Levansucrase für verschiedene Bakterien letal ist, wenn 5 % Saccharose im Medium sind (Gay et al, 1985). Dieses Gen dient als Marker für das gewünschte doppelte Crossover-Ereignis, welches zur Folge hat, dass das Plasmid aus dem Chromosom entfernt wird und nur die einzuführende Resistenzkassette anstelle des nun entfernten Zielgens zurücklässt. Zellen, die das Knock-out-Konstrukt über homologe Rekombination mit doppeltem Crossover in ihr Genom eingebaut haben, zeigen keine Sensitivität gegenüber Saccharose, da das auf dem Plasmid befindliche *sacB*-Gen nun nicht mehr vorliegt. Sie sind aber resistent gegenüber dem der verwendeten Resistenzkassette entsprechenden Antibiotikum.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle PCR-Produkte, die für die Fusion der einzelnen Knock-out-Konstrukte nötig sind, bereits einmal amplifiziert. Allerdings wurden noch keine ausreichenden Mengen der Fusionsprodukte hergestellt, sodass sie noch nicht in den Zielvektor kloniert werden konnten.

3.2 Heterologe Produktion von ModA und TupA

Für die Überproduktion von ModA und TupA wurde geplant, die gleichen Strategien wie für die heterologe Produktion der PDH und homologe Produktion der AOR zu verwenden. Die entsprechenden Gene sollten also mithilfe des kombinatorischen Klonierungssystems kloniert und entweder heterolog in *E. coli* oder homolog in *A. aromaticum* exprimiert werden. Anschließend sollten die Genprodukte über den angehängten Strep-Tag gereinigt werden. Dabei wurde überlegt, ModA und TupA sowohl mit als auch ohne die Signalpeptide, die zum Export der Proteine in das Periplasma führen, herzustellen. Dies sollte ermöglichen, optimale Produktions- und Faltungsbedingungen zu finden. Erste Experimente zu diesem Projekt wurden bereits durch die Technische Assistentin Iris Schall durchgeführt, lieferten aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch keine verwertbaren Ergebnisse.

4 Bioinformatische Analysen

In Debnar-Daumler et al (2014) werden einige bioinformatische Analysen präsentiert, die darauf abzielen, mögliche Wege aufzuzeigen wie *A. aromaticum* gleichzeitig spezifisch Molybdän- und Wolfram-Enzyme herstellen könnte. Dazu wurden verschiedene Molybdat- und Wolframat-Bindeproteine von ABC-Transportern betrachtet und verschiedene Sequenzen von MoeA-Proteinen, die das Metall auf den Moco oder Wco übertragen. Außerdem wurden alle Gene und Gen-Cluster untersucht, die potenziell an der Moco-Biosynthese in *A. aromaticum* beteiligt sind, und es wurde geprüft, welche nahen Verwandten von *A. aromaticum* eine AOR und ähnliche Aufnahme- und Übertragungssysteme für Molybdän und Wolfram enthalten.

Nach Sequenzierung des Genoms von *A. aromaticum* (Rabus et al, 2005) wurde festgestellt, dass dieses Bakterium nicht nur ein Gen für die hier hauptsächlich betrachtete AOR, sondern auch noch ein Gen für ein weiteres AOR-ähnliches Enzym besitzt. Mit beiden AORs aus *A. aromaticum* ist zudem ein Gen für ein MoaD eng assoziiert, dessen Produkt an der Biosynthese von Moco und Wco beteiligt ist. Daher werden im Folgenden die Verwandtschaftsverhältnisse verschiedener AORs und verschiedener MoaDs betrachtet.

4.1 Phylogenetische Analyse von AOR-Sequenzen

Um näheren Einblick in die mögliche Herkunft der AOR aus *A. aromaticum* und die Verteilung verschiedener anderer AOR-Sequenzen zu erhalten, wurde ein phylogenetischer Baum berechnet (Abbildung 13). Für das ihm zugrunde liegende Alignment wurden jeweils alle verfügbaren AOR-Sequenzen aus den Alpha-, Beta-, Gamma- und Epsilonproteobacteria verwendet. Aus den Deltaproteobacteria, Firmicutes und Archaea sind zu viele AOR-Sequenzen bekannt, um alle in einem Alignment zu berücksichtigen. Es wurde aber versucht, die große Zahl der Sequenzen für diese Gruppen widerzuspiegeln. Die große Zahl an AOR-Sequenzen aus den Deltaproteobacteria, Firmicutes und Archaea wurde ebenfalls versucht widerzuspiegeln. Dabei zeigte sich, dass die AORs aus den Beta- und Gammaproteobacteria einen gemeinsamen Ursprung zu haben scheinen, da sie alle von demselben Ast abzweigen. Die Sequenzen der Archaea spalten sich hingegen auf drei klar voneinander abgegrenzte Gruppen auf, während sich die Sequenzen aus Firmicutes und Deltaproteobacteria stärker über den ganzen Baum, mit Ausnahmen des Beta-/Gammaproteobacteria-Astes, verteilen. Die Genome von *A. aromaticum* und *Azoarcus* sp. KH32C enthalten jeweils zwei AOR-Sequenzen. Je eine lag auf dem Beta-/Gammaproteobacteria-Ast während die andere sich in einer taxonomisch relativ heterogenen Gruppe, aber zusammen mit den AOR-ähnlichen Sequenzen aus *E. coli* und *Proteus penneri* befand.

AOR
EbA5005



Abbildung 13. Phylogenetischer Baum von AOR-Orthologen aus verschiedenen Bacteria und Archaea. Das zugrunde liegende Alignment wurde durch das Programm Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) mit Standardeinstellungen berechnet. Die Beschriftungen der Äste sind nach folgendem Schema farblich codiert: **Gelb**, Alphaproteobacteria; **grün**, Betaproteobacteria; **rot**, Gammaproteobacteria; **orange**, Deltaproteobacteria; **pink**, Epsilonproteobacteria; **lila**, Firmicutes; **schwarz**, andere Bacteria; **blau**, Archaea. Die schwarzen Kästchen umrahmen die AOR-Sequenzen aus *A. aromaticum*. Aus den Alpha-, Beta-, Gamma- und Epsilonbacteria wurden jeweils alle zum Zeitpunkt der Erstellung über BLAST verfügbaren AOR-Sequenzen verwendet.

4.2 Phylogenetische Analyse von MoaD-Sequenzen

Vor Beginn der Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurde bereits entdeckt, dass das Genom von *A. aromaticum* zusätzlich zu EbA6672 zwei weitere MoaD-Proteine codiert (Debnar-Daumler, 2009). MoaD bildet zusammen mit MoaE die MPT-Synthase, die während der Synthese von Moco und Wco die Thiol-Gruppen auf cPMP überträgt (Leimkühler et al, 2011). Sie haben also nach dem aktuellen Kenntnisstand nichts mit dem Metall zu tun, das auf den Cofaktor übertragen wird. Die beiden zusätzlichen MoaDs in *A. aromaticum* sind aber sehr eng mit den beiden AOR-codierenden Sequenzen im Genom assoziiert. Eine Kopie wird durch das neu annotierte Gen *ebA5008* im *aor*-Operon codiert und die andere Kopie bildet eine C-terminale Domäne der AOR-1. Jede AOR scheint also ihr „eigenes“ MoaD zu besitzen. Deshalb wurden alle drei MoaD-Paraloge aus *A. aromaticum* mit Orthologen aus verschiedenen Bacteria und Archaea im Alignment verglichen, um zu sehen, ob auch andere Organismen mehrere MoaD-Kopien besitzen und wie diese in einem phylogenetischen Baum verteilt sind (Abbildung 14). Die beiden AOR-assozierten MoaD-Sequenzen aus *A. aromaticum* liegen auf einem gemeinsamen Hauptast des resultierenden Baumes. Dieser Ast umfasst hauptsächlich Sequenzen aus Genomen, die auch ein Gen für eine AOR enthalten. Die Sequenzen stammen aus den verschiedensten taxonomischen Gruppen. Das Protein EbA6672 liegt auf einem Hauptast mit überwiegend anderen MoaDs aus Beta- und Gammaproteobacteria, von denen nur wenige zusätzlich auch eine AOR enthalten. MoaD aus dem Wolfram-abhängigen Archaeon *P. furiosus* liegt auf einem taxonomisch ebenso heterogenen Hauptast wie die AOR-assozierten MoaD-Sequenzen. Diese Äste zweigen allerdings nicht nahe beieinander ab. Die vier Sequenzen, mit denen die MoaD-Domäne aus der AOR-1 auf einem Ast liegt, sind ebenfalls Domänen von AOR-ähnlichen Enzymen. Betaproteobacteria, die AOR-Sequenzen aufweisen, haben auch zwei MoaD-Sequenzen, wovon jeweils eine mit EbA5008 und die andere mit EbA6672 clustert.

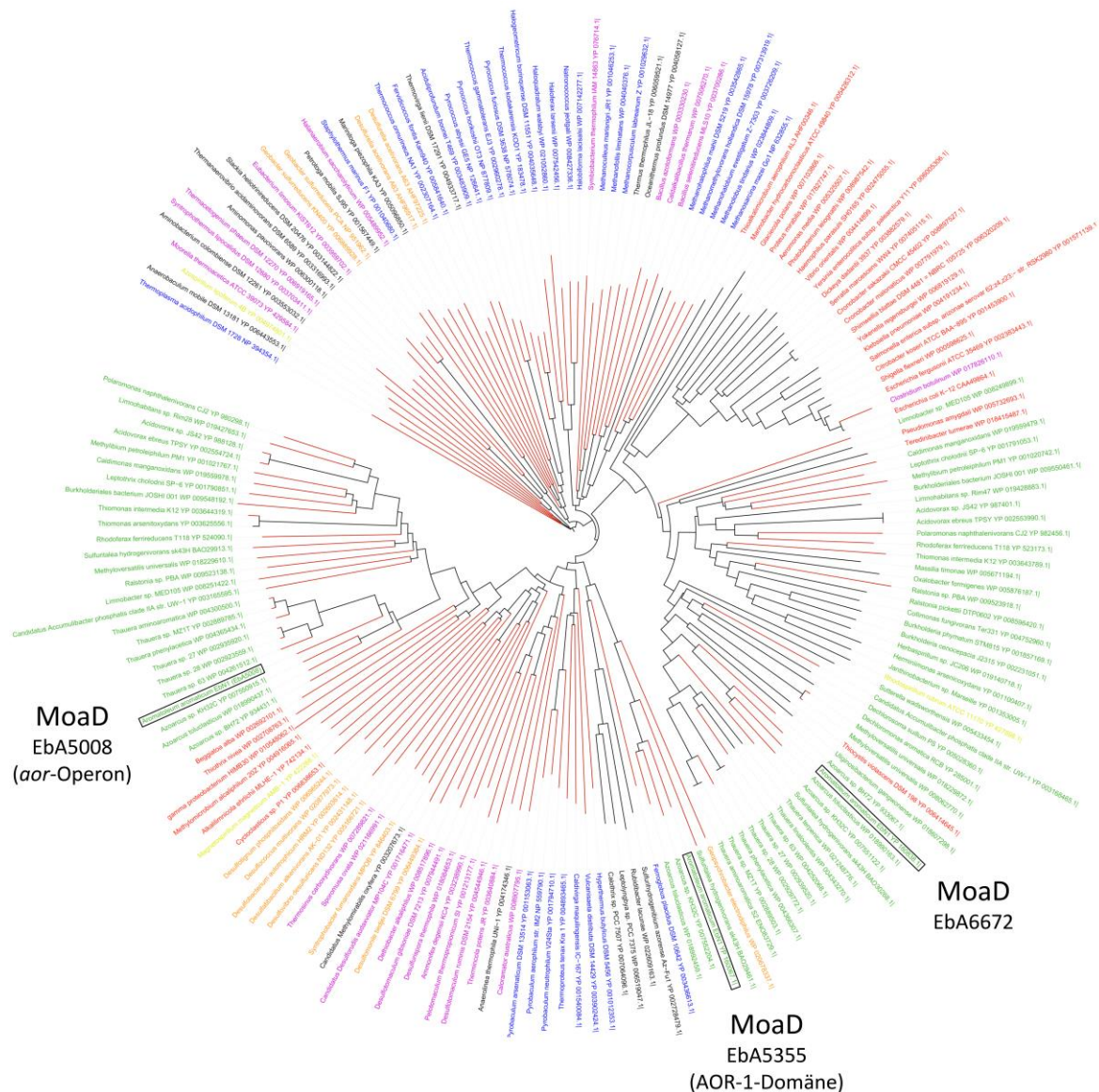


Abbildung 14. Phylogenetischer Baum der drei MoaD-Paralogs aus *A. aromaticum* und von MoaD-Orthologen aus verschiedenen Bacteria und Archaea. Das zugrunde liegende Alignment wurde durch das Programm Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) mit Standardeinstellungen berechnet. Als Vorlage für die BLAST-Suche wurden die drei MoaD-Sequenzen aus *A. aromaticum*, die MoaD-Sequenz aus *E. coli* und die MoaD-Sequenz aus *P. furiosus* verwendet. Die Sequenzen aus *A. aromaticum* sind EbA6672, das neu annotierte EbA5008 aus dem aor-Operon und die Domäne aus AOR-1. Die Beschriftungen der entsprechenden Äste sind schwarz umrahmt. Die Beschriftungen der Äste sind nach folgendem Schema farblich codiert: **Gelb**, Alphaproteobacteria; **grün**, Betaproteobacteria; **rot**, Gammaproteobacteria; **orange**, Deltaproteobacteria; **pink**, Epsilonproteobacteria; **lila**, Firmicutes; **schwarz**, andere Bacteria; **blau**, Archaea.

Diskussion

Ziele der vorliegenden Arbeit waren, die Biochemie des anaeroben Phenylalanin-Metabolismus von *A. aromaticum* zu untersuchen und die ursprünglich vorhergesagte Rolle der AOR zu bestätigen. Auf dem Weg zur Erreichung dieser Ziele wurden folgende Hauptkenntnisse gewonnen. In *A. aromaticum* gibt es mindestens zwei Enzyme, die die Oxidation von Phenylacetaldehyd katalysieren – AOR und PDH. Entgegen der ursprünglichen Annahme ist nicht die AOR sondern die PDH das für den Phenylalanin-Metabolismus spezifische Enzym. Die Rolle der AOR wurde also nicht bestätigt. Stattdessen wurde die PDH als neues Enzym entdeckt und charakterisiert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die AOR Wolfram enthält. Daraus resultiert die Erkenntnis, dass *A. aromaticum* gleichzeitig Molybdän-Enzyme (z. B. Nitrat-Reduktase) und Wolfram-Enzyme (z. B. AOR) synthetisiert. Diese sehr ungewöhnliche Eigenschaft und mögliche Mechanismen für die Metall-spezifische Synthese werden am Ende der Diskussion erörtert.

1 Phenylacetaldehyd-Oxidation durch AOR und PDH

1.1 Charakterisierung der PDH

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der anaerobe Phenylalanin-Stoffwechsel von *A. aromaticum* untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Oxidation von Phenylacetaldehyd zu Phenylacetat (Einleitung, Kap. 2, Abbildung 1). Ursprünglich war für die Katalyse dieses Schritts eine Aldehyd-Dehydrogenase erwartet worden (Rabus et al, 2005). Das Gen dieser Aldehyd-Dehydrogenase (*ebA5381*) befindet sich auf dem Genom von *A. aromaticum* in der Nähe der Gene für die Enzyme des Phenylacetat-Abbaus. Die Analyse des funktionellen Proteoms von *A. aromaticum* (Wöhlbrand et al, 2007) zeigte allerdings, dass EbA5381 spezifisch beim Wachstum auf *p*-Cresol und nicht auf Phenylalanin induziert wird. Beim Wachstum auf Phenylalanin wurde stattdessen die beschriebene AOR gefunden, deren Aktivität bereits in einer früheren Studie (Debnar-Daumler, 2009) in *A. aromaticum*-Zellen, die anaerob auf Phenylalanin gewachsen waren, nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurden aber auch zwei Dehydrogenase-Aktivitäten gemessen, durch die Phenylacetaldehyd sowohl mit NAD als auch mit NADP oxidiert werden konnte. Das dafür verantwortliche Enzym wurde in der vorliegenden Arbeit angereichert, identifiziert, gereinigt und charakterisiert. Es wird durch das Gen *ebA4954* codiert, dessen Produkt ursprünglich als „Aldehyde dehydrogenase family protein“ annotiert war. In der vorliegenden Arbeit wird es Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase – PDH – genannt. Im Gegensatz zur AOR besitzt die PDH keinerlei Cofaktor, was wahrscheinlich die heterologe Produktion begünstigte. Dadurch, dass die PDH über den Strep-Tag leicht gereinigt werden konnte (Abbildung 11), war eine ausführliche biochemische Charakterisierung möglich.

Durch diese Charakterisierung wurden einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede, mit bekannten Phenylacetaldehyd-Dehydrogenasen aus *E. coli* (Rodríguez-Zavala et al, 2006) und *Brevibacterium* (Hirano et al, 2007) aufgedeckt. Als Gemeinsamkeiten wurden der sehr geringe K_m - bzw. $K_{0,5}$ -Wert für Phenylacetaldehyd ($< 10 \mu\text{M}$) und die starke Substrat-Inhibition durch Phenylacetaldehyd, nicht aber durch andere Aldehyde, gefunden. Im Gegensatz zu den Phenylacetaldehyd-Dehydrogenasen aus *E. coli* und *Brevibacterium* und auch im Gegensatz zur AOR zeigte die PDH eine hohe Spezifität für Phenylacetaldehyd und war kaum in der Lage andere, besonders auch aromatische, Aldehyde zu oxidieren. Zudem wies die PDH eine positiv kooperative Kinetik für Phenylacetaldehyd, aber nicht für andere Aldehyde auf, was auf eine Substrat-spezifische Evolution des Enzyms hinweist. Ein weiterer Gegensatz wurde in den Affinitäten zu den Coenzymen NAD und NADP gefunden. Während die PDH einen 10-fach

geringeren K_m -Wert für NADP (42 μM) als für NAD (441 μM) aufwies (Debnar-Daumler et al, 2014), wurden für das *E. coli*-Enzym nahezu umgekehrte Verhältnisse gefunden (220 μM und 35 μM ; Rodríguez-Zavala et al, 2006). Auch die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase aus *Brevibacterium* zeigte eine deutlich geringere Aktivität mit NADP als mit NAD (6 %; Hirano et al, 2007). Allerdings findet die Katalyse in *A. aromaticum* *in vivo* höchstwahrscheinlich trotzdem auch mit NAD statt. Diese Annahme beruht auf einer Studie von Bennett et al (2009), in der absolute Konzentrationen verschiedener Metabolite in *E. coli* bestimmt wurden. Darin wurde gefunden, dass *E. coli* 2,6 mM NAD aber nur 2,1 μM NADP und 83 μM NADH aber 120 μM NADPH enthielt. Sollten diese Konzentrationsverhältnisse auch in *A. aromaticum* vorherrschen, würde die Phenylacetaldehyd-Oxidation mit NAD als Elektronenakzeptor begünstigt.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die PDH bestimmte Eigenschaften besitzt, die sie Phenylacetaldehyd von anderen Aldehyden unterscheiden lässt, da weder Kooperativität noch Substratinhibition mit anderen Aldehyden beobachtet wurden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, eine Kristallstruktur der PDH zu bestimmen, um im Anschluss zum Beispiel verschiedene Aldehyde in das aktive Zentrum hinein zu modellieren und herauszufinden wie die Substratinhibition funktioniert. Über die Strep-getagte Variante der PDH könnte leicht eine ausreichende Menge reinen Enzyms zur Verwendung für Kristallisationsansätze hergestellt werden.

1.2 Aufgaben von PDH und AOR in der Zelle

Im Laufe meiner Masterarbeit (Debnar-Daumler, 2009) und der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass *A. aromaticum* zur gleichen Zeit zwei verschiedene Enzyme produzierte, die die Oxidation von Phenylacetaldehyd zu Phenylacetat katalysierten. Daher stellt sich nun die Frage, welches Enzym spezifisch für den Phenylalanin-Metabolismus ist und welche Funktion das andere Enzym hat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Kontrast zur Anfangshypothese, dass die AOR das Hauptenzym im Phenylalanin-Abbaupfad ist. Stattdessen weisen sie darauf hin, dass die PDH diese Aufgabe übernimmt. Sie weist sowohl eine hohe Spezifität als auch eine hohe Affinität für Phenylacetaldehyd auf. Außerdem begünstigt die positiv kooperative Kinetik, die für Phenylacetaldehyd gefunden wurde eine schnelle Umsetzung des Substrates. Zusätzlich wurde gefunden, dass die Aktivität der PDH für anaerobes Wachstum von *A. aromaticum* auf Phenylalanin ausreicht und gleichermaßen die Aktivität der AOR hierfür nicht benötigt wird. Während der Versuche, die PDH nativ aus *A. aromaticum*-Zellen aufzureinigen, wurde einmal auch die Phenylpyruvat-Decarboxylase stark angereichert. Die beiden Enzyme PDH und PDC könnten einen lockeren Enzymkomplex gebildet haben. Da die PDC durch die Decarboxylierung

von Phenylpyruvat das Substrat der PDH bereitstellt, spricht diese Beobachtung auch für eine wichtige Rolle der PDH im Phenylalanin-Metabolismus.

Die AOR spielt also keine eindeutige Rolle beim Abbau von Phenylalanin. Stattdessen ist es vorstellbar, dass dieses Enzym wichtig wird, wenn der Stoffwechsel von *A. aromaticum* aus dem Gleichgewicht gerät und sich dadurch Aldehyde anreichern. Wenn dies geschieht, müssen die Aldehyde detoxifiziert werden, da sie sehr reaktiv sind und DNA und Proteine carbonylieren können. Auf diese Weise können sie Mutationen herbeiführen oder den Stoffwechsel weiter beeinträchtigen (O'Brien et al, 2005). Für die Rolle der AOR als detoxifizierendes Enzym sprechen das breite Substratspektrum und die variable Aktivität der AOR in unter verschiedenen Bedingungen angezogenen *A. aromaticum*-Kulturen (z. B. Flaschen oder Fermenter). Eine ähnliche Funktion als primär detoxifizierendes Enzym wurde auch schon für die AOR aus *Thermococcus sp.* ES1 vorgeschlagen (Heider et al, 1995) während in vielen anderen Organismen bisher hauptsächlich Aldehyd-Dehydrogenasen als detoxifizierende Enzyme beschrieben wurden (O'Brien et al, 2005; Wang et al, 2009).

Näheren Einblick in die tatsächlichen Aufgaben von PDH und AOR im Stoffwechsel von *A. aromaticum* könnten unter anderen die Knock-out-Experimente liefern, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorbereitet wurden (Ergebnisse, Kapitel 3.1).

1.3 Die AOR als Wolfram-Enzym

Entsprechend allen weiteren bisher beschriebenen AOR-Enzymen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die AOR aus *A. aromaticum* ein Wolfram-Cofactor gefunden. Wolfram ist das Element mit der höchsten Ordnungszahl im Periodensystem der Elemente, das einen positiven Effekt für Lebewesen hat. Es befindet sich in derselben Gruppe wie Molybdän und besitzt auch sehr ähnliche Eigenschaften. Dieser Umstand hat wahrscheinlich auch dazu geführt, dass beide Metalle in den meisten Enzymen durch den gleichen Cofaktor koordiniert werden. Wolfram- und Molybdän-Enzyme werden daher auch zusammen klassifiziert und in vier Enzymfamilien aufgeteilt (s. Einleitung, Kap. 3). Trotz der Ähnlichkeit zwischen beiden Metallen wurden für zwei der vier Molybdän- und Wolfram-Enzymfamilien, den Xanthin- und Sulfat-Oxidasen, bisher ausschließlich Vertreter beschrieben, die Molybdän enthalten (Bever et al, 2009). Genauso verhält es sich mit den stets Wolfram enthaltenden Enzymen aus der AOR-Familie. In *Proteus vulgaris* wurde das bisher einzige AOR-ähnliche Enzym, das Molybdän enthält, gefunden (Trautwein et al, 1994). In der DMSO-Reduktase-Familie kommen hingegen sowohl Molybdän- als auch Wolfram-Enzyme vor. Zu ihnen gehören die gut charakterisierte Nitrat-

Reduktase aus *E. coli* (Bertero et al, 2003) und die Formiat-Dehydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* (Raaijmakers et al, 2002).

Zu Beginn der Erforschung der Wolfram-Enzyme wurde vermutet, dass diese Enzyme hauptsächlich in den (hyper)thermophilen anaeroben Archaea vorkommen, da diese Organismen häufig in Umgebungen mit hoher Wolframat-Konzentration leben. Zudem sind die bisher bekannten AORs genau wie die anaeroben Archaea sehr sauerstoffempfindlich. Inzwischen werden aber immer mehr bakterielle AORs charakterisiert, und die bekannten Genome lassen darauf schließen, dass AORs keineswegs nur typisch für extremophile Prokaryonten sind, die bei hohen Wolfram-Konzentrationen leben.

Dennoch wurde am Anfang dieser Arbeit in Betracht gezogen, dass die AOR aus *A. aromaticum* Molybdän enthalten könnte. Denn dieses Bakterium benötigt die Molybdän-haltige Nitrat-Reduktase für das denitrifizierende Wachstum, und die gleichzeitige Produktion von Mo- und W-Enzymen wurde bisher nur selten beobachtet (Hagen, 2011; Sevcenco et al, 2010). Weiterhin wäre dies die erste beschriebene Wolfram enthaltende AOR aus einem fakultativ anaeroben Organismus.

Durch verschiedene Experimente konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden, dass die AOR aus *A. aromaticum* tatsächlich Wolfram enthält. AOR-Aktivität in Zellen, die auf Phenylalanin gewachsen waren, wurde nur in W-supplementierten Kulturen gefunden. Zudem war die Aktivität unabhängig von der Molybdän-Konzentration im Wachstumsmedium. Folglich kann Wolfram in der AOR nicht wirksam durch Molybdän ersetzt werden. Beim Versuch, native AOR aus *A. aromaticum* durch chromatographische Methoden zu reinigen, konnte trotz 600-facher Anreicherung kein reines Protein erzielt werden. Dennoch stieg die AOR-Aktivität zusammen mit der Wolfram-Konzentration in den angereicherten Fraktionen an, während in denselben Fraktionen kein Molybdän mittels IPC-MS detektiert wurde. Im Zusammenhang zeigen diese Ergebnisse, dass die AOR aus *A. aromaticum* Wolfram für ihre Phenylacetaldehyd-oxidierende Aktivität benötigt.

1.4 Biochemie der AOR

Zusätzlich zum Metallcofaktor wurden in der vorliegenden Arbeit auch verschiedene biochemische Eigenschaften der AOR untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sie über ein breites Substratspektrum verfügt und bei Experimenten mit Zellextrakt neben Phenylacetaldehyd auch alle sechs weiteren Aldehyde, die getestet wurden, oxidierte. Zwei dieser Aldehyde, Benzaldehyd (144 %) und Glutardialdehyd (111 %), wurden sogar schneller als Phenylacetaldehyd

umgesetzt. Ein breites Substratspektrum wurde bisher bei fast allen biochemisch charakterisierten AORs zum Beispiel aus *Thermococcus* sp. ES1, *Eubacterium acidaminophilum* und *Pyrococcus furiosus* gefunden (Bevers et al, 2005; Heider et al, 1995; Mukund & Adams, 1991; Rauh et al, 2004; Roy et al, 1999). Im Gegensatz zu den AORs aus zum Beispiel *Thermococcus* sp. ES1 (Heider et al, 1995) oder aus *E. acidaminophilum* (Rauh et al, 2004) war die *A. aromaticum*-AOR aber an Luft erstaunlich stabil und zeigte nach 220 min Sauerstoffkontakt immer noch 75 % der Anfangsaktivität (Debnar-Daumler et al, 2014). Diese Eigenschaft stellt möglicherweise eine Anpassung an die fakultativ anaerobe Lebensweise von *A. aromaticum* dar. Diese Hypothese wird auch durch die hier durchgeführte phylogenetische Analyse (Abbildung 13) untermauert. In dem berechneten phylogenetischen Baum clustert die AOR aus *A. aromaticum* zusammen mit AORs aus verschiedenen ebenfalls fakultativ anaeroben oder sogar microaerophilen und aeroben Bacteria aus den Klassen der Alpha- (z. B. *Magnetospirillum magnetotacticum*; Maratea & Blakemore, 1981), Beta- (z. B. *Methyloversatilis universalis*; Kalyuzhnaya et al, 2006) und Gammaproteobacteria (z. B. *Beggiatoa alba*; Schmidt et al, 1987). Folglich kann man vermuten, dass diese AORs möglicherweise eine spezielle, an sauerstoffhaltige Umgebungen angepasste Gruppe bilden.

2 Molybdän- und Wolfram-Enzyme

2.1 Einfluss von Wolfram auf das Zellwachstum

Alle bisher bekannten Eukaryonten und viele Bacteria und Archaea sind abhängig von Molybdän, da die Molybdän-Enzyme essentielle Schritte im Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelmetabolismus katalysieren. Solche essentiellen Schritte sind zum Beispiel die Nitrat-Reduktion, katalysiert durch die assimilatorische Nitrat-Reduktase in Pflanzen und Pilzen, die Sulfit-Oxidation zu Sulfat durch die Sulfit-Oxidase als terminaler Schritt im oxidativen Abbau von Cystein und Methionin beim Menschen oder der letzte Schritt im Purin-Abbau der Säugetiere durch die Xanthin-Oxidase (Mendel, 2005). Es gibt aber auch einige Prokaryonten, die statt auf Molybdän auf Wolfram angewiesen sind. Zu ihnen gehören zum Beispiel die hyperthermophilen Archaeen *Pyrobaculum aerophilum* (Afshar et al, 1998) und *Pyrococcus furiosus* (Bryant & Adams, 1989). Aber auch Sulfat-reduzierende Bakterien müssen unter Umständen Strategien entwickeln, anstelle von Molybdän Wolfram in ihre Enzyme einzubauen. Hohe Sulfid-Konzentrationen, die durch die Aktivität von Sulfat-reduzierenden Bakterien entstehen, bewirken nämlich, dass die Verfügbarkeit von Molybdat sinkt. Dies geschieht durch die Bildung von Thiomolybdaten (MoS_2), wenn die Oxide durch Sulfide substituiert werden (Mendel, 2005; Stiefel, 2002). Folglich ist Molybdän für diese Bakterien kaum noch verfügbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass das denitrifizierende Wachstum von *A. aromaticum* durch hohe Wolframat-Konzentrationen (ab $1 \mu\text{M}$) im Medium inhibiert wurde. Gleichzeitig mit der Wachstumsrate bei hohen W-Konzentrationen sank auch die Nitrat-Reduktionsrate. Dies geschieht höchstwahrscheinlich dadurch, dass die Zellen fälschlicherweise W anstelle von Mo in die Nitrat-Reduktase (Nar) einbauen, was zu deren Inaktivierung führt (Debnar-Daumler et al, 2014). Da dieses Enzym jedoch für denitrifizierendes Wachstum essentiell ist, ist demnach auch *A. aromaticum* von Mo abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die hingegen W-abhängige AOR als ein Enzym identifiziert, in welchem der Wolfram-Cofaktor nicht wirksam durch einen Molybdän-Cofaktor ersetzt werden konnte (s. Ergebnisse, Kapitel 1.4.2). Bei Abwesenheit von Wolframat war aber kein Unterschied im Wachstum festzustellen. Folglich ist *A. aromaticum* nicht von Wolfram abhängig. Demnach ist auch die Wolfram-haltige AOR nicht grundsätzlich essentiell beim denitrifizierenden Wachstum auf Phenylalanin. Die AOR wurde jedoch aus Zellen angereichert, die denitrifizierend auf Phenylalanin gewachsen waren. Folglich muss *A. aromaticum* Mechanismen besitzen, um diese sehr ähnlichen Metalle spezifisch auf die richtigen Enzyme zu übertragen, damit diese gleichzeitig funktionieren können. Denn die

vorliegenden Daten belegen, dass sowohl AOR als auch Nar von der Anwesenheit des jeweils passenden Metalls abhängig sind.

2.2 Gleichzeitige Produktion von Mo- und W-Enzymen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *A. aromaticum* mindestens ein Mo-Enzym für das denitrifizierende Wachstum auf Phenylalanin braucht. Bei diesem Mo-Enzym handelt es sich um die dissimilatorische Nitrat-Reduktase (Nar), die den ersten Schritt der Denitrifikation von Nitrat zu Nitrit katalysiert (Zumft, 1997). Dieses Enzym wurde für *E. coli* ausführlich charakterisiert (Bertero et al, 2003; Wang et al, 1999). Die Aminosäuresequenz seiner katalytischen Untereinheit (NarG), die auch den Moco enthält, stimmt zu 60 % mit der Sequenz des Genprodukts von *ebA6286* aus *A. aromaticum* überein. Höchstwahrscheinlich wird auch noch ein weiteres Mo-Enzym benötigt, das sogar im Phenylalanin-Abbaupfad vorkommt – die Phenylacetyl-CoA:Akzeptor-Oxidoreduktase. Diese katalysiert die Oxidation von Phenylacetyl-CoA zu Phenylglyoxylat. Sie wurde aus *Thauera aromatica* gereinigt und charakterisiert (Rhee & Fuchs, 1999). Ihre Eigenschaften weisen Ähnlichkeiten mit denen der DMSO-Reduktase auf, sie wurde jedoch noch keiner Mo-Enzymfamilie explizit zugeordnet. Folglich muss *A. aromaticum* unter Bedingungen bei denen die AOR benötigt wird, gleichzeitig ein W-Enzym und mindestens ein Mo-Enzym herstellen, um denitrifizierend wachsen zu können. *A. aromaticum* kann nämlich weder die Nar mit W substituieren, noch die AOR mit Mo (s. Ergebnisse, Kapitel 1.3 und Diskussion, Kapitel 2.1).

In wenigen anderen Organismen wurde bereits die gleichzeitige Produktion von W- und Mo-Enzymen beobachtet. *Pyrobaculum aerophilum* produziert bei relativ geringen Molybdat- und Wolframat-Konzentrationen von 0,5 bzw. 0,4 μM eine Mo-Nar und eine W-AOR (Afshar et al, 2001; Hagedoorn et al, 2005) und kann bei 10-fach erhöhten W-Mengen im Medium sogar eine aktive W-Nar produzieren (de Vries et al, 2010). Dies wäre mit einer Anpassung von *P. aerophilum* an die üblicherweise sehr hohen W-Konzentrationen in seiner Umgebung zu erklären. Die beiden Sulfat-reduzierenden *Desulfovibrio*-Arten *alaskensis* und *vulgaris* Hildenborough haben verschiedene Formiat-Dehydrogenasen (FDHs), die entweder spezifisch Molybdän oder Wolfram enthalten und je nach Verfügbarkeit der Metalle induziert werden (da Silva et al, 2011; Mota et al, 2011). Möglicherweise werden die FDHs unter bestimmten Bedingungen auch gleichzeitig produziert.

Diese Organismen brauchen also ein effektives System, das es erlaubt, die Metalle spezifisch auf die entsprechenden Zielenzyme zu übertragen. Bisher sind die Mechanismen noch nicht bekannt,

die es einem Organismus erlauben, gleichzeitig spezifisch W auf das eine Enzym und Mo auf das andere Enzym zu übertragen.

2.3 Strategien zur Diskriminierung von Mo und W bei der Biosynthese

Wie in der Einleitung beschrieben, werden Mo und W in Enzymen über sehr ähnliche Cofaktoren – Moco und Wco – koordiniert. Diese Cofaktoren bestehen aus dem Metallopterin als Grundgerüst und dem Metall. Das Metallopterin kann nach Einbau des Metalls je nach Zielenzym gegebenenfalls noch weiter modifiziert werden. Aufgrund des gleichen Aufbaus des Cofaktor-Grundgerüsts nimmt seine Biosynthese auch denselben Verlauf unter Beteiligung der überwiegend gleichen Enzyme, unabhängig vom Metall, das auf den Cofaktor übertragen wird. Die Stellen, die darüber entscheiden könnten, welches Metall auf welches Enzym übertragen wird, sollten also begrenzt sein. Vier Möglichkeiten ergeben sich, um die Verwendung von Molybdän oder Wolfram für spezifische Enzyme zu regulieren. (i) Der Transport der Oxoanionen in die Zelle; (ii) die Übertragung des Metalls auf den Cofaktor; (iii) die Übertragung des fertigen Cofaktors auf das Zielenzym; (iv) eine Transkriptions- und/oder Translationsregulation der beteiligten Gene und Enzyme, gesteuert durch die jeweiligen Oxoanionen oder die fertigen Cofaktoren.

2.3.1 Transport von Molybdat und Wolframat

Sowohl Molybdän als auch Wolfram werden in ihrer einzigen biologisch verfügbaren Form, nämlich als Oxoanionen Molybdat (MoO_4^{2-}) und Wolframat (WO_4^{2-}), in die Zelle transportiert. Dazu verwenden die Zellen ABC-Transporter. Diese bestehen aus einem periplasmatischen Bindeprotein, das das Oxoanion bindet, einem Transmembranprotein, über das der Transport erfolgt und einem ATP-bindenden Protein, das die Energie für den Transport bereitstellt. Die Spezifität für ein bestimmtes Oxoanion wird hauptsächlich über das periplasmatische Bindeprotein vermittelt. Als Molybdat-Transporter wurde ModABC aus *E. coli* schon ausführlich erforscht (Hollenstein et al, 2007; Self et al, 2001). Bei diesem Transporter hat das periplasmatische Bindeprotein mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von 20 nM die gleiche Affinität für Molybdat wie für Wolframat (Imperial et al, 1998). Für den Transport von Wolframat wurden bisher zwei verschiedene Transporter gefunden. Aus *Eubacterium acidaminophilum* ist TupABC bekannt (Makdessi et al, 2001), dessen periplasmatisches Bindeprotein TupA eine K_D -Konstante für Molybdat von 1 μM und für Wolframat von <10 nM zeigt (Andreesen & Makdessi, 2008). Der zweite Wolframat-Transporter ist WtpABC aus *Pyrococcus furiosus*, dessen

periplasmatisches Bindeprotein WtpA ebenfalls eine deutlich höhere Affinität zu Wolframat (K_D 17 pM) als zu Molybdat (K_D 11 nM) hat (Bever et al, 2006).

Ein mutmaßliches Operon, das einen ModABC-Transporter codiert, wurde im *A. aromaticum*-Genom identifiziert (Rabus et al, 2005). Die Annotation von Gen *ebA2721* als ModA wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch ein Alignment bestätigt (Debnar-Daumler et al, 2014). Zusätzlich wurden die Gene für einen möglichen Wolframat-spezifischen TupABC-Transporter identifiziert. Das Bindeprotein TupA (codiert durch *ebA3597*) teilt 64 % Sequenzidentität mit dem entsprechenden Protein aus *E. acidaminophilum* und clustert in einem phylogenetischen Baum eindeutig zusammen mit anderen TupA-Proteinen (Fig. 6, Debnar-Daumler et al, 2014). Auffällig ist, dass die Proteine TupB und TupC (codiert durch *ebA5014* und *ebA5015*) in einer Operon-ähnlichen Struktur in der unmittelbaren Nähe des *aor*-Operons codiert sind. Für die TupA-Proteine aus *E. acidaminophilum* und *Campylobacter jejuni* wurde gezeigt, dass sie eine deutlich höhere Affinität zu Wolframat als zu Molybdat haben (Andreesen & Makdessi, 2008; Smart et al, 2009). Außerdem ist die Affinität dieser Proteine zu Wolframat sogar noch deutlich stärker als die von ModA. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Transportern könnte *A. aromaticum* die Aufnahme und damit die Konzentrationen von Molybdat und Wolframat in der Zelle fein regulieren.

2.3.2 Übertragung der Metalle auf den Cofaktor

Die Metallatome aus den aufgenommenen Oxoanionen werden am Ende der Biosynthese von Moco und Wco auf das Metallopterin übertragen. Dieser Schritt wird durch das Enzym MoeA katalysiert. Dabei spaltet MoeA MPT-AMP und überträgt anschließend das Metall auf die beiden Thiol-Gruppen (Leimkühler et al, 2011; Nichols et al, 2007). Bever et al. (2009) stellten fest, dass viele Organismen zwei Gene in ihren Genomen enthalten, die MoeA-Paraloge codieren und haben spekulierten, dass dies eine Möglichkeit sein könnte, gleichzeitig Molybdän- und Wolfram-Enzyme zu produzieren. Im Genom von *A. aromaticum* sind sogar drei MoeA-Paraloge codiert, MoeA1 (*ebA6673*), MoeA2 (*ebA1078*) und MoeA3 (*ebA4355*) (Debnar-Daumler et al, 2014). Ähnliche Sequenzen wurden auch in allen anderen bekannten Genomen der Betaproteobacteria gefunden, die ein *aor*-Gen enthalten. Aus diesen Sequenzen und einigen anderen Orthologen wurde ein Alignment berechnet und dieses als phylogenetischer Baum dargestellt (Fig. S7, Debnar-Daumler et al, 2014). Dieser Baum zeigt, dass möglicherweise MoeA1 und MoeA2 spezifisch Mo auf den Cofaktor übertragen könnten, während MoeA3 spezifisch für W sein könnte, da es im Baum näher bei Sequenzen aus Wolfram-abhängigen Organismen liegt. Um nähere Informationen zu erhalten, müssten die verschiedenen MoeAs einzeln aufgereinigt und auf ihre Affinität gegenüber

verschiedenen Metallen überprüft werden. In einem solchen Experiment würde man beispielsweise die Intensität der Fluoreszenz von Tryptophan-Resten betrachten, die sich je nach Affinität zum vorhandenen Liganden unterschiedlich stark verändern sollte gegenüber dem Zustand in Abwesenheit des Liganden (Vivian & Callis, 2001).

2.3.3 Übertragung des Cofaktors auf die Zielenzyme

Sobald das Metall auf den Cofaktor übertragen wurde, ist der Zielenzym-unabhängige Teil der Cofaktor-Biosynthese abgeschlossen. Es folgen gegebenenfalls weitere Modifikationen am Pterin und die Übertragung auf das Zielenzym. Bei diesem Schritt ist bisher wenig über regulatorische Mechanismen bekannt. DMSO-Reduktasen und Xanthin-Dehydrogenasen besitzen sogenannte „Private Chaperones“, die für die Übertragung des Cofaktors auf das Enzym benötigt werden (Blasco et al, 1998; Leimkühler & Klipp, 1999). Dies ist möglicherweise auch ein wichtiger Schritt zur Metallspezifität. Für AORs ist allerdings bisher kein vergleichbarer Mechanismus bekannt.

2.3.4 Transkriptions- und Translationsregulation des Mo- und W-Metabolismus

Um das Zusammenspiel von Molybdat- und Wolframat-Transportern, Cofaktor-Biosynthese-Apparat und Molybdän- und Wolframenzymen zu steuern, existieren verschiedene Möglichkeiten der Transkriptions- und Translationsregulation. Für die Transkriptionsregulation sorgt in *E. coli* beispielsweise das Protein ModE, das auf dem Gegenstrang direkt upstream zum *modABCD*-Operon codiert ist. ModE reprimiert die Transkription von *modABCD*, wenn entweder Molybdat oder Wolframat vorhanden ist (Anderson et al, 1997; Grunden et al, 1996). Außerdem aktiviert ModE die Transkription von *moeABCDE* in der Anwesenheit von Molybdat (Anderson et al, 2000). Dies wird aber nur sichtbar, wenn kein Moco vorhanden ist, da andernfalls die Translation der *moe*-mRNA gleichzeitig durch einen Riboswitch inhibiert wird. (s. u.). ModE hemmt also die Aufnahme von Molybdat und aktiviert den Molybdat-Verbrauch in Form der Moco-Biosynthese, wenn ausreichend Molybdat in der Zelle vorliegt. In *A. aromaticum* wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Kandidaten identifiziert, die die Rolle von ModE übernehmen könnten. Der eine wird durch *ebA2947* codiert. Dieses Gen liegt auf dem Genom in einem Cluster zusammen mit dem Gen für MobA, welches Moco zum Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid modifiziert. Der andere Kandidat wird durch *ebA3600* codiert. Dieses Gen liegt in einem Cluster zusammen mit *tupA* (*ebA3597*).

Die Möglichkeit einer Translationsregulation wurde durch Regulski et al (2008) aufgezeigt. Sie fanden in Genomen von verschiedenen Bacteria die sogenannte Moco-RNA – einen Riboswitch, der Moco als Liganden bindet. Die Moco-RNA reguliert die Translation von Enzymen, die

entweder an der Moco-Biosynthese beteiligt sind, oder die einen Moco enthalten. Zum Beispiel sitzt eine Moco-RNA bei *E. coli* direkt upstream des *moeABCDE*-Operons und reprimiert die Translation, solange ausreichend Moco vorhanden ist. Dieser Riboswitch wirkt also im Zusammenspiel mit MoDE und ermöglicht so eine genau abgestimmte Regulation der Moco-Biosynthese. Die Moco-RNA reagiert nicht auf die Anwesenheit eines Wolfram-Cofaktors. Allerdings fanden Regulski et al Varianten der Moco-RNA, die spezifisch für Wco (bzw. Tuco bei Regulski et al) sein könnten. Im Zusammenhang mit der Erforschung der Moco-Biosynthese und der spezifischen Produktion von Mo- und W-Enzymen in *A. aromaticum* würde es sich lohnen, auch in diesem Genom auf die Suche nach entsprechenden Riboswitches zu gehen.

2.3.5 Assoziation von *aor*- und *moaD*-Genen

Eine weitere Auffälligkeit im Zusammenhang mit der spezifischen Produktion von Mo- und W-Enzymen ist die enge Assoziation von MoaD-Domänen mit AORs. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass sowohl die untersuchte AOR in ihrem Operon ein Gen für ein MoaD enthält, als auch dass die AOR-1 aus *A. aromaticum* eine MoaD-Domäne enthält. MoaD bildet eine Untereinheit der MPT-Synthase, die während der Moco-Biosynthese die Thiol-Gruppen auf das cPMP überträgt. Eine phylogenetische Analyse (Ergebnisse, Kap. 4.2) zeigte, dass die AOR-assoziierten MoaD-Sequenzen aus *A. aromaticum* ähnlich sind zu Orthologen aus taxonomisch sehr diversen Prokaryonten, die aber nahezu alle auch ein Gen für eine AOR enthielten. Die AOR-unabhängige MoaD-Sequenz EbA6672 lag im phylogenetischen Stammbaum hingegen auf einem Hauptast mit überwiegend anderen MoaDs aus Beta- und Gammaproteobacteria, von denen nur wenige zusätzlich auch eine AOR enthielten. Außerdem zeigte ein Abgleich mit der Seed-Datenbank, dass die enge Assoziation von MoaD und AOR nicht nur in *A. aromaticum* auftritt (Abbildung 15). Anscheinend ist diese Anordnung von Genen weit verbreitet und kommt in den meisten Taxa vor, sofern eine *aor*-Sequenz vorhanden ist. Dies ist ein Indiz für die Notwendigkeit eines speziellen MoaD-Orthologs für die spezifische W-Cofaktor-Synthese einer AOR. Folglich kann man vermuten, dass die späten Schritte der Moco- und Wco-Biosynthese in einer Art Enzymkomplex stattfinden, der je nach Zielenzym durch das Vorhandensein der verschiedenen MoaD-Isoformen „markiert“ sein könnte. Neben der Lage des *moaD*-Gens ist in einigen bakteriellen Genomen auch das Gen für das Ferredoxin upstream der *aor*-Sequenz konserviert. In den archaeellen Genomen ist hingegen zusätzlich zum *moaD* ein weiteres Moco- bzw. Wco-Biosynthese-Gen konserviert.

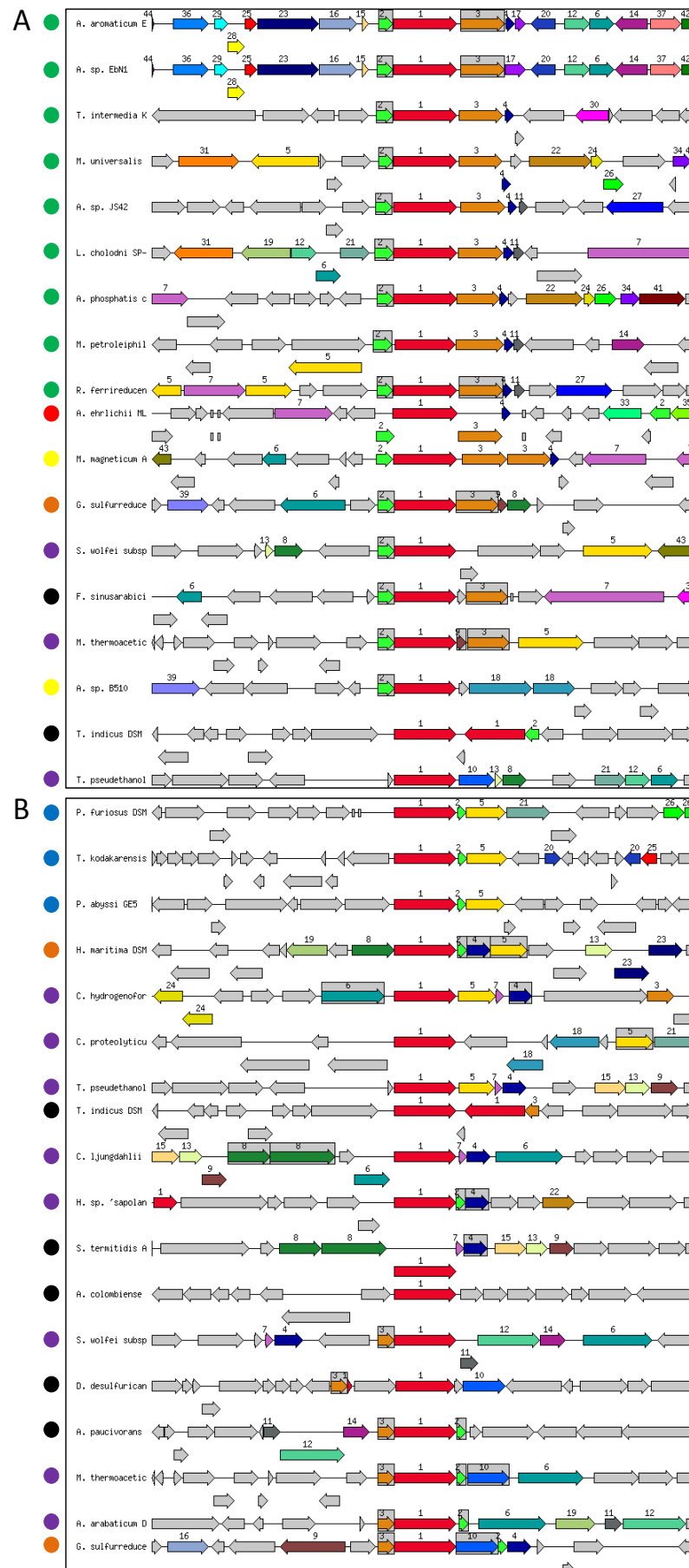


Abbildung 15: Abgleich der *aor*-Gencluster aus den Genomen von *A. aromaticum* (A) und *P. furiosus* (B) mit der Seed-Datenbank. Die farbigen Punkte am Anfang jeder Zeile geben Aufschluss über die taxonomische Zugehörigkeit der Genome: **gelb, α -Proteobacteria; **grün**, β -Proteobacteria; **rot**, γ -Proteobacteria; **orange**, δ -Proteobacteria; **violett**, Firmicutes; **schwarz**, andere Bacteria; **blau**, Archaea. Das *aor*-Gen ist in beiden Abbildungen mit der Ziffer 1 gekennzeichnet. In (A) sind *moaD*-ähnliche Gene mit den Ziffern 4, 9, und 13 gekennzeichnet. In (B) sind *moaD*-ähnliche Gene mit den Ziffern 2 und 7 gekennzeichnet.**

3 Ausblick

Die Resultate der vorliegenden Arbeit öffnen den Weg zu einem neuen Forschungsfeld mit dem Modellorganismus *A. aromaticum*, der Koproduktion von Molybdän- und Wolframenzymen. Daher ergeben sich am Ende dieser Arbeit eine Fülle von neuen Experimentieransätzen und Forschungsthemen.

Eines davon ist die genauere Charakterisierung der AOR besonders im Hinblick auf ihre hohe Sauerstoff-Toleranz, ihre Eigenschaft als Wolframenzym und die Abgrenzung der Aufgaben von AOR und PDH in der Zelle. Dazu müsste die Produktion und Reinigung der AOR verbessert werden. Für die homologe Überproduktion einer Strep-getagten AOR-Variante wurden die Plasmide in dieser Arbeit bereits hergestellt. Sollte sich die Hypothese bestätigen, dass die AOR eine detoxifizierende Wirkung hat, könnte darüber hinaus die Produktion der nativen AOR angeregt werden, indem die Kultur einem Aldehyd-Stress ausgesetzt würde. Außerdem könnte bei Wachstum auf Phenylalanin möglicherweise die Produktion der nativen AOR durch die Deletion der PDH angeregt werden. Dabei stellt sich aber auch die Frage, ob *A. aromaticum* ohne die PDH auf Phenylalanin noch wachsen kann. Auch die AOR könnte gleichzeitig oder unabhängig von der PDH deletiert werden. Dies würde einen tieferen Einblick in die Aufgaben der AOR ermöglichen.

Nachdem auf bioinformatischer Ebene je ein Transporter für Molybdat bzw. für Wolframat im Genom von *A. aromaticum* identifiziert wurde, könnte die Aufnahme der beiden Oxoanionen auf biochemischer und physiologischer Ebene weiter beleuchtet werden. Für die biochemische Charakterisierung der Transporter sollten ihre periplasmatischen Bindeproteine als getagte Varianten heterolog produziert werden, um eine Reinigung der Proteine zu ermöglichen. Im Anschluss könnten ihre Affinitäten zu verschiedenen Oxoanionen über eine Affinitätsstudie anhand der Fluoreszenz von Tryptophan-Resten untersucht werden. Dabei stellt sich die Frage, ob die Vorhersagen aus den bioinformatischen Analysen zutreffen. Für die physiologische Charakterisierung könnten Deletionsmutanten, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit schon vorbereitet wurden, hergestellt werden. Dabei wäre zu beachten, dass *A. aromaticum* ohne vollständigen Mod-Transporter zumindest bei den üblichen Molybdat-Konzentrationen im Medium höchstwahrscheinlich nicht mehr denitrifizierend wachsen kann aufgrund der Mo-Abhängigkeit der Nar. Bei höheren Konzentrationen könnte der Defekt aber wahrscheinlich durch unspezifischere Transporter ausgeglichen werden.

Zur Untersuchung des Metalleinbaus in den jeweiligen Pterin-Cofaktor wäre bei der biochemischen und physiologischen Charakterisierung der verschiedenen MoeA-Proteine, die in der vorliegenden Arbeit identifiziert wurden, ein ähnliches Vorgehen möglich. Auch hier sollten

die Affinitäten der gereinigten MoeA-Varianten zu verschiedenen Oxoanionen überprüft werden. Ein vertieftes Verständnis über die Funktion der verschiedenen MoeAs könnten Deletionsmutanten liefern. Dabei wäre besonders interessant wie sich die verschiedenen Stämme in Bezug auf die Produktion und Aktivitäten von Nar und AOR verhalten.

Für die Untersuchung der Transkriptions- und Translationsregulation von Mo- und W-Metabolismus sollten zunächst die beiden ModE-Kandidaten produziert und aufgereinigt werden. Im Anschluss wäre es möglich die Promotoren des *modABC*-Operons, des *tupA*-Gens und anderer repräsentativer Gene über Mutationen und Bindestudien mit den gereinigten ModE-Kandidaten zu charakterisieren. Im Hinblick auf mögliche Moco- bzw. Wco-sensitive Riboswitches könnte das Genom von *A. aromaticum* auf Grundlage der Daten von Regulski et al (2008) bioinformatisch analysiert werden.

Literatur

Afshar S, Johnson E, de Vries S, Schröder I (2001) Properties of a thermostable nitrate reductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Bacteriol* **183**: 5491-5495

Afshar S, Kim C, Monbouquette HG, Schröder I (1998) Effect of tungstate on nitrate reduction by the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3004-3008

Aguilar-Barajas E, Díaz-Pérez C, Ramírez-Díaz M, Riveros-Rosas H, Cervantes C (2011) Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals* **24**: 687-707

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410

Anderson LA, McNairn E, Lubke T, Pau RN, Boxer DH, Leubke T (2000) ModE-dependent molybdate regulation of the molybdenum cofactor operon *moa* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 7035-7043

Anderson LA, Palmer T, Price NC, Bornemann S, Boxer DH, Pau RN (1997) Characterisation of the molybdenum-responsive ModE regulatory protein and its binding to the promoter region of the *modABCD* (molybdenum transport) operon of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **246**: 119-126

Andreesen J, Ljungdahl L (1973) Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J Bacteriol* **116**: 867-873

Andreesen JR, Makdessi K (2008) Tungsten, the surprisingly positively acting heavy metal element for prokaryotes. *Incredible Anaerobes: From Physiology to Genomics to Fuels* **1125**: 215-229

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* **40**: 603

Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, Van Dien SJ, Rabinowitz JD (2009) Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* **5**: 593-599

Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300

Bertero MG, Rothery RA, Palak M, Hou C, Lim D, Blasco F, Weiner JH, Strynadka NCJ (2003) Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat Struct Biol* **10**: 681-687

- Bevers LE, Bol E, Hagedoorn PL, Hagen WR (2005)** WOR5, a novel tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* with a broad substrate specificity. *J Bacteriol* **187**: 7056-7061
- Bevers LE, Hagedoorn PL, Hagen WR (2009)** The bioinorganic chemistry of tungsten. *Coord Chem Rev* **253**: 269-290
- Bevers LE, Hagedoorn PL, Krijger GC, Hagen WR (2006)** Tungsten transport protein A (WtpA) in *Pyrococcus furiosus*: the first member of a new class of tungstate and molybdate transporters. *J Bacteriol* **188**: 6498-6505
- Blasco F, Dos Santos J-P, Magalon A, Frixon C, Guigliarelli B, Santini C-L, Giordano G (1998)** NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 435-447
- Boll M, Fuchs G (1995)** Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem* **234**: 921-933
- Bradford MM (1976)** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Bryant FO, Adams MWW (1989)** Characterization of Hydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 5070-5079
- Chan MK, Mukund S, Kletzin A, Adams MWW, Rees DC (1995)** Structure of a Hyperthermophilic Tungstopterin Enzyme, Aldehyde Ferredoxin Oxidoreductase. *Science* **267**: 1463-1469
- Chisnell JR, Premakumar R, Bishop PE (1988)** Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **170**: 27-33
- Cronin CN, Kim J, Fuller JH, Zhang X, McIntire WS (1999)** Organization and sequences of *p*-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase and other plasmid-encoded genes for early enzymes of the *p*-cresol degradative pathway in *Pseudomonas putida* NCIMB 9866 and 9869. *DNA seq* **10**: 7-17
- da Silva SM, Pimentel C, Valente FMA, Rodrigues-Pousada C, Pereira IAC (2011)** Tungsten and molybdenum regulation of formate dehydrogenase expression in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol* **193**: 2909-2916
- Davin L, Jourdes M, Patten A, Kim K-W, Vassão D, Lewis N (2008)** Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly: comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. *Nat Prod Rep* **25**: 1015-1090
- de Vries S, Momcilovic M, Strampraad MJF, Whitelegge JP, Baghai A, Schröder I (2010)** Adaptation to a high-tungsten environment: *Pyrobaculum aerophilum* contains an active tungsten nitrate reductase. *Biochemistry* **49**: 9911-9921
- Debnar-Daumler C (2009)** Anaerober Abbau von Phenylalanin in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1: Oxidation von Phenylacetaldehyd zu Phenylacetat.

- Debnar-Daumler C, Seubert A, Schmitt G, Heider J (2014)** Simultaneous Involvement of a Tungsten-Containing Aldehyde:Ferredoxin Oxidoreductase and a Phenylacetaldehyde Dehydrogenase in Anaerobic Phenylalanine Metabolism. *J Bacteriol* **196**: 483-492
- Ehrlich F (1907)** Concerning the conditions for fusel oil formation and concerning its connection with the protein formation of yeast. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **40**: 1027-1047
- Einsle O, Tezcan FA, Andrade SLA, Schmid B, Yoshida M, Howard JB, Rees DC (2002)** Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. *Science* **297**: 1696-1700
- Ferrández A, Prieto MA, García JL, Díaz E (1997)** Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **406**: 23-27
- Fuchs G, Boll M, Heider J (2011)** Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nat Rev Micro* **9**: 803-816
- Gallagher SR (2001)** One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 10**: Unit 10.12B
- Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, Berkelman T, Kado CI (1985)** Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **164**: 918-921
- Green AA, Hughes WL (1955)** Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In *Methods in Enzymology*, Colowick SP, Kaplan NO (eds), Vol. 1, 10, pp 67-90. New York: Academic Press
- Grunden AM, Ray RM, Rosentel JK, Healy FG, Shanmugam KT (1996)** Repression of the *Escherichia coli* *modABCD* (Molybdate Transport) Operon by ModE. *J Bacteriol* **178**: 735-744
- Hagedoorn PL, Chen TH, Schröder I, Piersma SR, de Vries S, Hagen WR (2005)** Purification and characterization of the tungsten enzyme aldehyde:ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic denitrifier *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Inorg Chem* **10**: 259-269
- Hagen WR (2011)** Cellular uptake of molybdenum and tungsten. *Coord Chem Rev* **255**: 1117-1128
- Hales B, Case E, Morningstar J, Dzeda M, Mauterer L (1986)** Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* **25**: 7251-7255
- Heider J, Fuchs G (1997)** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* **243**: 577-596
- Heider J, Ma K, Adams MWW (1995)** Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon *Thermococcus* strain ES-1. *J Bacteriol* **177**: 4757-4764
- Hille R (2002)** Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem Sci* **27**: 360-367
- Hirano J-i, Miyamoto K, Ohta H (2007)** Purification and characterization of aldehyde dehydrogenase with a broad substrate specificity originated from 2-phenylethanol-assimilating *Brevibacterium* sp. KU1309. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 357-420

- Hirsch W, Schägger H, Fuchs G (1998)** Phenylglyoxylate:NAD oxidoreductase (CoA benzoylating), a new enzyme of anaerobic phenylalanine metabolism in the denitrifying bacterium *Azoarcus evansii*. *Eur J Biochem* **251**: 907-915
- Hoagland D (1945)** Molybdenum in relation to plant growth. *Soil Sci* **60**: 119
- Hollenstein K, Frei DC, Locher KP (2007)** Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **446**: 213-216
- Horner CK, Burk D (1942)** Nitrogen fixation by *Azotobacter* as influenced by molybdenum and vanadium. *J Agr Research* **65**: 0173-0193
- Imperial J, Hadi M, Amy NK (1998)** Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli* mod molybdate transport system. *Biochim Biophys Acta* **1370**: 337-346
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Kalyuzhnaya MG, De Marco P, Bowerman S, Pacheco CC, Lara JC, Lidstrom ME, Chistoserdova L (2006)** *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp. nov., a novel taxon within the *Betaproteobacteria* represented by three methylotrophic isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2517-2522
- Kessler D, Herth W, Knappe J (1992)** Ultrastructure and pyruvate formate-lyase radical quenching property of the multienzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 18073-18079
- Kisker C, Schindelin H, Rees DC (1997)** Molybdenum-cofactor-containing enzymes: Structure and mechanism. *Annu Rev Biochem* **66**: 233-267
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM (1995)** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176
- Kuwayama H, Obara S, Morio T, Katoh M, Urushihara H, Tanaka Y (2002)** PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res* **30**: e2
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Leimkühler S, Klipp W (1999)** Role of XDHC in Molybdenum Cofactor Insertion into Xanthine Dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **181**: 2745-2751
- Leimkühler S, Wuebbens MM, Rajagopalan KV (2011)** The History of the Discovery of the Molybdenum Cofactor and Novel Aspects of its Biosynthesis in Bacteria. *Coord Chem Rev* **255**: 1129-1144
- Magalon A, Fedor JG, Walburger A, Weiner JH (2011)** Molybdenum enzymes in bacteria and their maturation. *Coord Chem Rev* **255**
- Makdessi K, Andreesen JR, Pich A (2001)** Tungstate Uptake by a Highly Specific ABC Transporter in *Eubacterium acidaminophilum*. *J Biol Chem* **276**: 24557-24564

- Maratea D, Blakemore RP (1981)** *Aquaspirillum magnetotacticum* sp. nov., a Magnetic Spirillum. *Int J Syst Bacteriol* **31**: 452-455
- Mendel RR (2005)** Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton Trans*: 3404-3409
- Mendel RR, Kruse T (2012)** Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1568-1579
- Mohamed MES, Fuchs G (1993)** Purification and characterization of phenylacetate-coenzyme A ligase from a denitrifying *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of phenylacetate. *Arch Microbiol* **159**: 554-562
- Mohamed MES, Seyfried B, Tschech A, Fuchs G (1993)** Anaerobic oxidation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-coenzyme A and CO₂ in denitrifying *Pseudomonas* sp. - Evidence for an alpha-oxidation mechanism. *Arch Microbiol* **159**: 563-573
- Mota CS, Valette O, González PJ, Brondino CD, Moura JIG, Moura I, Dolla A, Rivas MG (2011)** Effects of molybdate and tungstate on expression levels and biochemical characteristics of formate dehydrogenases produced by *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491. *J Bacteriol* **193**: 2917-2923
- Mukund S, Adams MWW (1991)** The Novel Tungsten-Iron-Sulfur Protein of the Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, Is an Aldehyde Ferredoxin Oxidoreductase - Evidence for its Participation in a Unique Glycolytic Pathway. *J Biol Chem* **266**: 14208-14216
- Mukund S, Adams MWW (1995)** Glyceraldehyde-3-phosphate Ferredoxin Oxidoreductase, a Novel Tungsten-containing Enzyme with a Potential Glycolytic Role in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* **270**: 8389-8392
- Murray MG, Thompson WF (1980)** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325
- Nichols JD, Xiang S, Schindelin H, Rajagopalan KV (2007)** Mutational analysis of *Escherichia coli* MoeA: Two functional activities map to the active site cleft. *Biochemistry* **46**: 78-86
- Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P (2001)** Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* **128**: 1019-1050
- O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N (2005)** Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Crit Rev Toxicol* **35**
- Pfennig N (1978)** *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring-shaped, vitamin B12-requiring member of the family Rhodospirillaceae. *Int J Syst Bacteriol* **28**: 283-288
- Raaijmakers H, Macieira S, Dias JM, Teixeira S, Bursakov S, Huber R, Moura JIG, Moura I, Romão MJ (2002)** Gene Sequence and the 1.8 Å Crystal Structure of the Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Structure* **10**: 1261-1272

- Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K, Widdel F, Reinhardt R (2005)** The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* **183**: 27-36
- Rabus R, Widdel F (1995)** Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* **163**: 96-103
- Rauh D, Graentzdoerffer A, Granderath K, Andreessen JR, Pich A (2004)** Tungsten-containing aldehyde oxidoreductase of *Eubacterium acidaminophilum* - Isolation, characterization and molecular analysis. *Eur J Biochem* **271**: 212-219
- Regulski EE, Moy RH, Weinberg Z, Barrick JE, Yao Z, Ruzzo WL, Breaker RR (2008)** A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. *Mol Microbiol* **68**: 918-932
- Rhee SK, Fuchs G (1999)** Phenylacetyl-CoA:acceptor oxidoreductase, a membrane-bound molybdenum-iron-sulfur enzyme involved in anaerobic metabolism of phenylalanine in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* **262**: 507-515
- Rodríguez-Zavala JS, Allali-Hassani A, Weiner H (2006)** Characterization of *E. coli* tetrameric aldehyde dehydrogenases with atypical properties compared to other aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci* **15**: 1387-1396
- Roy R, Adams MWW (2002)** Characterization of a fourth tungsten-containing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **184**: 6952-6956
- Roy R, Mukund S, Schut GJ, Dunn DM, Weiss R, Adams MWW (1999)** Purification and Molecular Characterization of the Tungsten-Containing Formaldehyde Ferredoxin Oxidoreductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: the Third of a Putative Five-Member Tungstoenzyme Family. *J Bacteriol* **181**: 1171-1180
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994)** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73
- Schmidt TM, Arieli B, Cohen Y, Padan E, Strohl WR (1987)** Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba*. *J Bacteriol* **169**: 5466-5472
- Schneider S, Mohamed MES, Fuchs G (1997)** Anaerobic metabolism of L-phenylalanine via benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch Microbiol* **168**: 310-320
- Schrödinger, LLC. (2010)** The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3.
- Schwarz G, Mendel RR, Ribbe MW (2009)** Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**: 839-847

- Schweiger P, Volland S, Deppenmeier U (2007)** Overproduction and characterization of two distinct aldehyde-oxidizing enzymes from *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Mol Microbiol Biotechnol* **13**: 147-155
- Self WT, Grunden AM, Hasona A, Shanmugam KT (2001)** Molybdate transport. *Res Microbiol* **152**: 311-321
- Sevcenco A-M, Bevers LE, Pinkse MWH, Krijger GC, Wolterbeek HT, Verhaert PDEM, Hagen WR, Hagedoorn P-L (2010)** Molybdenum Incorporation in Tungsten Aldehyde Oxidoreductase Enzymes from *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology* **192**: 4143-4152
- Smart JP, Cliff MJ, Kelly DJ (2009)** A role for tungsten in the biology of *Campylobacter jejuni*: tungstate stimulates formate dehydrogenase activity and is transported via an ultra-high affinity ABC system distinct from the molybdate transporter. *Mol Microbiol* **74**: 742-757
- Stiefel EL (2002)** The biogeochemistry of molybdenum and tungsten. *Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes* **39**: 1-29
- Tarvin D, Buswell AM (1934)** The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J Am Chem Soc* **56**: 1751-1755
- Teufel R, Mascaraque V, Ismail W, Voss M, Perera J, Eisenreich W, Haehnel W, Fuchs G (2010)** Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 14390-14395
- Trautwein T, Krauss F, Lottspeich F, Simon H (1994)** The (2R)-hydroxycarboxylate-viologen-oxidoreductase from *Proteus vulgaris* is a molybdenum-containing iron-sulphur protein. *Eur J Biochem* **222**: 1025-1032
- Vivian JT, Callis PR (2001)** Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. *Biophys J* **80**: 2093-2109
- Wang H, Tseng C-P, Gunsalus RP (1999)** The *napF* and *narG* nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. *J Bacteriol* **181**: 5303-5308
- Wang M-F, Han C-L, Yin S-J (2009)** Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chem Biol Interact* **178**: 36-39
- Weretilnyk EA, Hanson AD (1990)** Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2745-2754
- Wilson K (2001)** Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al]* **Chapter 2**
- Wöhlbrand L, Kallerhoff B, Lange D, Hufnagel P, Thiermann J, Reinhardt R, Rabus R (2007)** Functional proteomic view of metabolic regulation in "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1. *Proteomics* **7**: 2222-2239
- Wöhlbrand L, Rabus R (2009)** Development of a Genetic System for the Denitrifying Bacterium '*Aromatoleum aromaticum*' Strain EbN1. *J Mol Microbiol Biotechnol* **17**: 41-52

Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478

Zhou H-X, Rivas G, Minton A (2008) Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu Rev Biophys* **37**: 375-397

Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533-616

Anhang

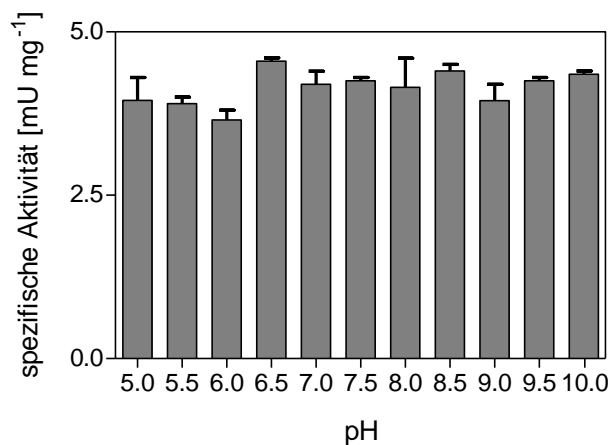


Abbildung 16. Spezifische Aktivität der AOR in Extrakt von anaerob auf Phenylalanin gewachsenen *A. aromaticum*-Zellen nach Inkubation bei verschiedenen pH-Werten. Dieses Experiment wurde durchgeführt um festzustellen ob verschiedene pH-Werte die Aktivität der AOR beeinflussen. Dies sollte Aufschluss darüber geben, bei welchen pH-Werten Reinigungsschritte durchgeführt werden könnten. Verschiedene pH-Werte spielen bei der Reinigung von Proteinen eine große Rolle, da sie dazu führen, dass sich die Ladungsverhältnisse an der Oberfläche der Proteine und somit auch deren Bindungseigenschaften verändern. In diesem Experiment wurden Aliquots von Extrakten von *A. aromaticum*-Zellen, die anaerob auf Phenylalanin gewachsen waren, mit jeweils der gleichen Menge Puffer mit einem bestimmten pH-Wert gemischt und 30 min im Anaerobenzelt inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte erneut mit der gleichen Menge Puffer (pH-Wert 8,4) gemischt und die AOR-Aktivität wie beschrieben durch die Zunahmen von reduziertem Benzylviologen bei 600 nm gemessen. Für die ausgewählten pH-Werte konnten keine deutlichen Unterschiede in den Aktivitäten festgestellt werden.

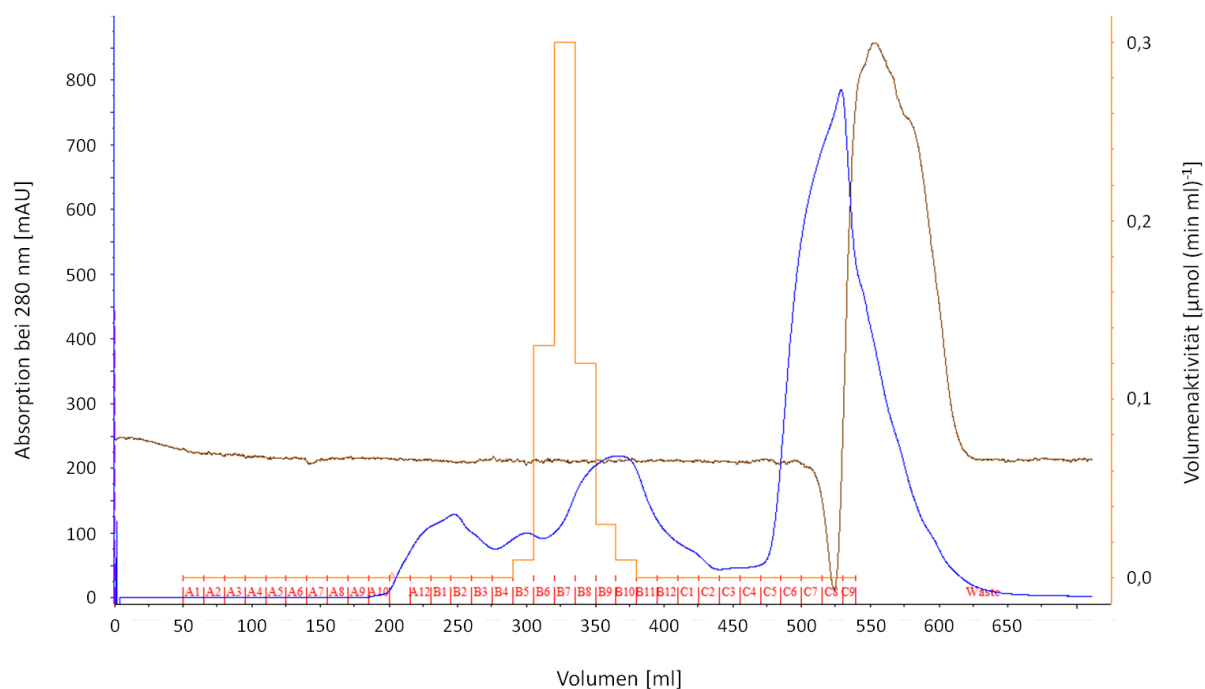


Abbildung 17. Anreicherung der AOR-Aktivität durch Gelfiltration (Superdex 200 PrepGrade, 570 ml) aus einem DEAE-Aktivitätspool. Die Proteine wurden in Fraktionen von 15 ml aufgefangen. **(Blau)** UV-Absorption bei 280 nm; **(braun)** Leitfähigkeit der flüssigen Phase nach der Säule; **(orange)** AOR-Volumenaktivität.

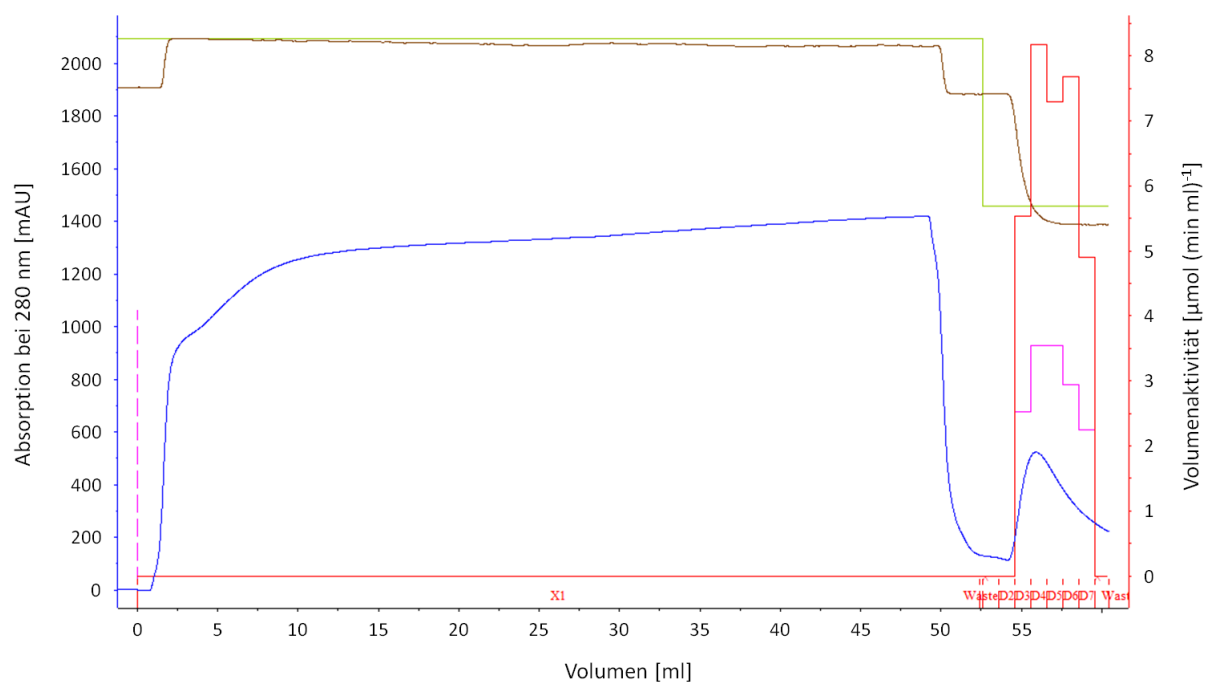


Abbildung 18. Anreicherung der NAD(P)-abhängigen Aktivitäten mit Butylsepharose (high performance, 1 ml) aus einem DEAE-Aktivitätspool. Die Ammoniumsulfat-Konzentration in Puffer B betrug 500 mM. Eluiert wurde in einem Schritt mit 350 mM Ammoniumsulfat. Während der Elution wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. **(Blau)** UV-Absorption bei 280 nm, **(grün)** Eluentkonzentration in % Puffer B, **(braun)** Leitfähigkeit der flüssigen Phase nach der Säule, **(rot)** NADP-abhängige Phenylacetaldehyd-oxidierende Volumenaktivität, **(violett)** NAD-abhängige Phenylacetaldehyd-oxidierende Volumenaktivität.

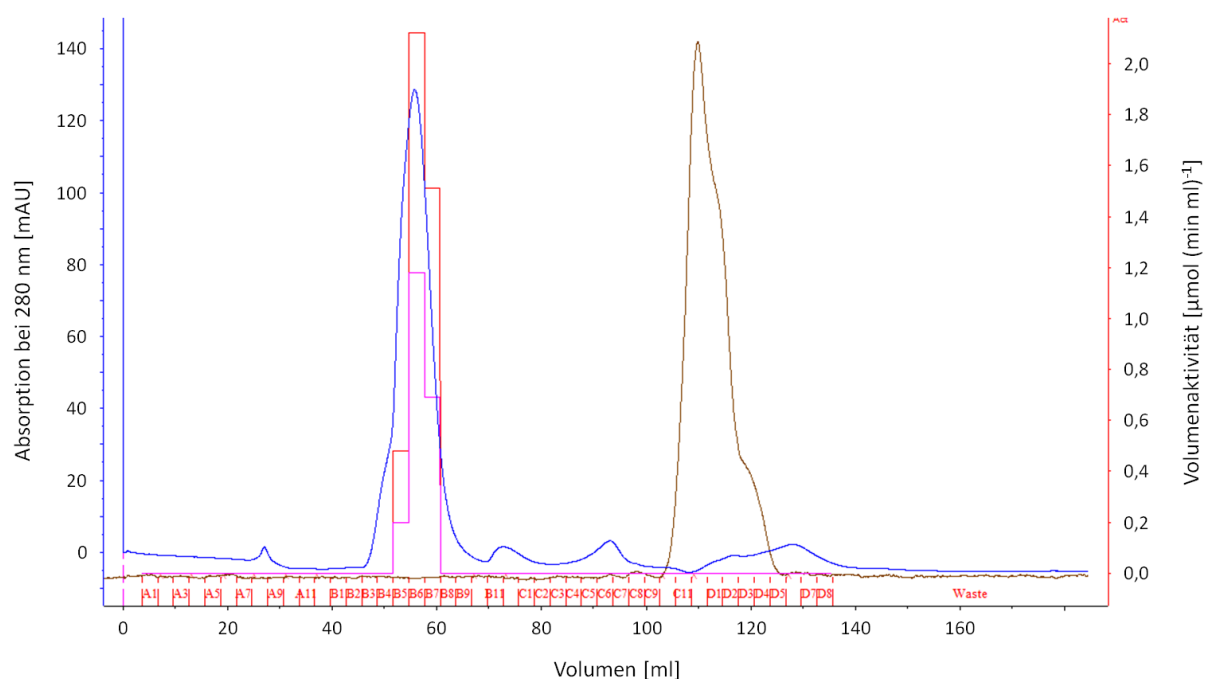


Abbildung 19. Anreicherung der NAD(P)-abhängigen Aktivitäten über Gelfiltration (Superdex 75 prep grade, 120 ml) aus einem Butyl-Sepharose-Aktivitätspool. Die Proteine wurden in Fraktionen von 3 ml aufgefangen. **(Blau)** UV-Absorption bei 280 nm; **(braun)** Leitfähigkeit der flüssigen Phase nach der Säule; **(rot)** NADP-abhängige Phenylacetaldehyd-oxidierende Volumenaktivität, **(violett)** NAD-abhängige Phenylacetaldehyd-oxidierende Volumenaktivität.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Johann Heider für die Möglichkeit dieses sehr interessante Thema zu bearbeiten und die stetige Hilfsbereitschaft bei Fragen und Diskussionsbedarf. Außerdem danke ich Dir dafür, dass ich meine Arbeit auf verschiedenen Fachtagungen präsentieren konnte.

Prof. Dr. Wolfgang Buckel danke ich herzlich für die Bereitschaft zur Ausstellung des zweiten Gutachtens und die hilfreiche Kritik im Rahmen der Treffen meines IMPRS-Komitees.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission Prof. Dr. H.-U. Mösch und Prof. Dr. A. Batschauer sowie den weiteren Mitgliedern meines IMPRS Komitees Prof. Dr. A. Brune und Prof. Dr. M. Thanbichler.

Dr. Karola Schühle danke ich für ihre Hilfe bei methodischen Fragen und bei Diskussionsbedarf. Deine verständnisvolle Art hat immer wieder Mut gemacht und geholfen, schwierige Phasen zu überstehen.

Dr. Georg Schmitt danke ich für die gute Zusammenarbeit und das exzellente wissenschaftliche Feedback zu dieser Arbeit.

Marco Hornung danke ich für seine besondere Hilfsbereitschaft bei Problemen mit FPLC und Computern.

Patricia Wagner danke ich herzlich für ihre Unterstützung bei allerlei organisatorischen Fragen und bei der Planung von Reisen zu Fachtagungen.

Den Arbeitsgruppen Heider und Buckel danke ich ganz besonders für die tolle Arbeitsatmosphäre, die fröhliche Stimmung und immerwährende Hilfsbereitschaft im Labor. Es macht Spaß mit euch zu arbeiten und auch Pausen zu verbringen!

Meine Freunde und Kollegen Gabi Höff, Johanna Mock und Marco Hornung haben mir ebenfalls die Pausen versüßt und für gute Ausgleichs neben der Doktorarbeit gesorgt. Darauf ein „großes Tichu“!

Meinen Eltern und meinem Mann Hendrik danke ich von ganzem Herzen für hilfreiche Gespräche, ihre fortwährende Unterstützung, dafür, dass sie unerschütterlich zu mir stehen und unseren wunderbaren Zusammenhalt auch in schweren und traurigen Zeiten. Ihr habt mir immer den Rücken gestärkt und damit geholfen, diese Arbeit zu meistern. Meinem Vater danke ich besonders dafür, dass er mit seinem Erfindungsreichtum die Motivation entfachen konnte, die ich gebraucht habe, um diese Arbeit fertig zu schreiben.

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Name Lisa Lena Carlotta Debnar-Daumler
Geburtsdatum 18.07.1985
Geburtsort Frankfurt am Main

Promotion

2009-2014 **Doktorarbeit** an der Philipps-Universität Marburg, Fachgebiet Mikrobiologie bei Prof. Dr. Johann Heider
Thema: Aldehyd-oxidierende Enzyme im anaeroben Phenylalanin-Stoffwechsel von *Aromatoleum aromaticum*

Stipendien

2010-2012 **SciMento-hessenweit** – Mentoring für Wissenschaftlerinnen
 Mentorin: Prof. Dr. Renate Deinzer
 2009-2012 **International Max Planck Research School** for Environmental, Cellular and Molecular Microbiology (IMPRS-Mic), **Promotionsstipendium**

Hochschulbildung

2007-2009 Studiengang **Molecular and Cellular Biology** mit Abschluss Master of Science an der Philipps-Universität Marburg
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie
Master-Arbeit an der Philipps-Universität bei Prof. Dr. Johann Heider
Thema: Anaerober Abbau von Phenylalanin in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 – Oxidation von Phenylacetaldehyd zu Phenylacetat
 2004-2007 Studiengang **Biologie** mit Abschluss Bachelor of Science an der Philipps-Universität Marburg
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Zellbiologie
Bachelor-Arbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg bei Prof. Dr. Michael Friedrich
Thema: Analyse der Tetrachlorethen-dechlorierenden mikrobiellen Gemeinschaft in anoxischen Sedimenten aus der Elbe

Schulbildung

2001-2004 Friedrich-Dessauer-Gymnasium Frankfurt
 Allgemeine Hochschulreife
 1995-2001 Weingartenschule Kriftel
 1991-1995 Lindenschule Kriftel

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Aldehyd-oxidierende Enzyme im anaeroben Phenylalanin-Stoffwechsel von *Aromatoleum aromaticum*“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 20.10.2014

Carlotta Debnar-Daumler